

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Felduntersuchung zum Vorkommen von *porcine
reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV)
in präkolostralen Ferkelseren sowie im Thymus und
in den Tonsillen toter Saugferkel

von Steffanie Senf

aus Naumburg

München 2017

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Krankheiten des Schweines

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Mitbetreuung durch: Dr. Matthias Eddicks

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Müller

Tag der Promotion: 29. Juli 2017

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Historischer Überblick	3
2.	Ätiologie.....	4
2.1.	Taxonomie und Morphologie	4
2.2.	Genomische Struktur	4
3.	Epidemiologie	5
3.1.	Geographische Verbreitung.....	5
3.2.	Erregerübertragung	5
3.2.1.	Vertikale Übertragung	6
3.2.2.	Horizontale Übertragung	6
3.2.2.1.	Direkte Übertragung.....	6
3.2.2.2.	Indirekte Übertragung	7
4.	Pathogenese.....	8
4.1.	Zielzellen.....	8
4.2.	Allgemeine Pathogenese	8
4.3.	Aufbau und Funktion der Schweineplazenta	9
4.4.	Pathogenese der Reproduktionsstörungen.....	10
4.5.	Pathogenese im Fetus.....	11
5.	Klinisches Erscheinungsbild.....	12
5.1.	Reproduktionsstörungen	12
5.2.	Respiratorische Störungen	13
6.	Diagnostik	14
6.1.	Pathologische Veränderungen.....	14
6.2.	Direkter Erregernachweis.....	16
6.3.	Direkter Erregernachweis im totgeborenen Ferkel	17
6.4.	Indirekter Erregernachweis	18
7.	Impfung	19
7.1.	Lebendimpfstoffe	20
7.2.	Totimpfstoffe.....	21

III.	MATERIAL UND METHODEN	23
1.	Ziel der Arbeit.....	23
2.	Auswahl der untersuchten Bestände und Studientiere.....	23
2.1.	Gruppe 1	23
2.2.	Gruppe 2	25
3.	Gewinnung der Blutproben.....	27
3.1.	Sauen	28
3.2.	Ferkel	28
4.	Erfassung der Paritäten.....	28
5.	Tote Ferkel	29
6.	Verarbeitung und Lagerung der Proben	29
7.	Labordiagnostische Untersuchungen.....	30
7.1.	Serologische Untersuchungen	30
7.2.	Molekularbiologische Untersuchungen	31
7.2.1.	Extraktion viraler RNA aus Serum	31
7.2.2.	Extraktion viraler RNA aus fetalen Organen	31
7.2.3.	PCR.....	32
7.2.4.	Sequenzierung	33
8.	Statistische Auswertung	34
IV.	ERGEBNISSE.....	35
1.	Gruppe 1	35
1.1.	Paritäten und Zuordnung der Ferkel.....	35
1.2.	Serologische Untersuchung	35
1.2.1.	Sauen	35
1.2.1.1.	Einzeltiere	35
1.2.1.2.	Auswertung auf Bestandsebene	36
1.2.1.3.	Auswertung nach Impfstatus.....	36
1.2.1.4.	Auswertung nach Parität.....	38
1.2.2.	Ferkel	39
1.3.	Molekularbiologische Untersuchung	39
1.3.1.	Sauen	39
1.3.2.	Ferkel	39

2.	Gruppe 2.....	39
2.1.	Paritäten und Zuordnung der Ferkel zu den Sauen.....	39
2.2.	Serologische Untersuchung.....	40
2.2.1.	Sauen	40
2.2.1.1.	Einzeltiere	40
2.2.1.2.	Auswertung auf Bestandsebene	40
2.2.1.3.	Auswertung nach Impfstatus	40
2.2.1.4.	Auswertung nach Parität	41
2.2.2.	Ferkel	42
2.3.	Molekularbiologische Untersuchung.....	42
2.3.1.	Sauen	42
2.3.2.	Ferkel	42
2.3.2.1.	Lebendgeborene Ferkel	43
2.3.2.1.1.	Einzeltiere	43
2.3.2.1.2.	Auswertung auf Bestandsebene	44
2.3.2.1.3.	Auswertung nach Würfen	44
2.3.2.1.4.	Sequenzierung	45
2.3.2.2.	Tote Ferkel	46
2.3.2.2.1.	Einzeltiere	46
2.3.2.2.2.	Auswertung auf Bestandsebene	47
2.3.2.2.3.	Auswertung nach Würfen	48
2.4.	Ergebnisse der Untersuchung der Serumproben der Sauen der PRRSV-positiven Ferkel.....	51
V.	DISKUSSION	53
1.	Diskussion der Ergebnisse der Gruppe 1.....	53
1.1.	Sauen	53
1.2.	Ferkel	55
2.	Diskussion der Ergebnisse der Gruppe 2.....	58
2.1.	Sauen	58
2.2.	Ferkel	61
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	67
VII.	SUMMARY	69

VIII.	TABELLENVERZEICHNIS	71
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	73
X.	LITERATURVERZEICHNIS.....	75
XI.	DANKSAGUNG	103

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
BALF	bronchoalveolar lavage fluid
Ct	cycle treshold
dFA	direct fluorescent antibody
EAV	equine arteritis virus
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
g	mittlere Erdbeschleunigung
GP	Glykoprotein
h	Stunde
HS-GAG	Heparansulfat-Glykosaminoglykan
Hz	Hertz
IFAT	indirect fluorescent antibody test
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IPMA	immunoperoxidase monolayer assay
ISH	In-situ-Hybridisierung
kb	Kilo-Basenpaare
km	Kilometer
KV	killed virus
LDV	lactate dehydrogenase-elevating virus
M	Matrixprotein
min	Minuten
ml	Milliliter
MLV	modified-live virus
mm	Millimeter
N	Nukleokapsidprotein
n.d.	nicht durchgeführt
nm	Nanometer
nsp	Nichtstrukturprotein

OFS	oral fluid samples
ORF	open reading frame
p.i.	post infectionem
P/PK	Probe/Positive-Kontrolle
PCR	polymerase chain reaction
PCV2	Porzines Circovirus Typ 2
pH	potentia Hydrogenii
PPV	Porzines Parvovirus
PRDC	porcine respiratory disease complex
PRRS	porcine reproductive and respiratory syndrome
PRRSV	porcine reproductive and respiratory syndrome virus
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SHFV	simian hemorrhagic fever virus
SJPL	St. Jude Porcine Lung Cells
SN	Sialoadhesin
SNT	Serumneutralisationstest
TCID ₅₀	50% tissue culture infective dose
TT	Trächtigkeitstag
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

I. EINLEITUNG

Das porcine reproductive and respiratory syndrome (PPRS) ist eine Viruserkrankung, welche, bis auf wenige Ausnahmen, in schweineproduzierenden Ländern endemisch verbreitet ist (ZIMMERMAN et al., 2012). Sie führt zu hohen wirtschaftlichen Verlusten, die NIEUWENHUIS et al. (2012) für die Niederlande mit durchschnittlich 126€ pro Sau und 18 Wochen andauernder Ausbruchsphase beziffern.

Für eine Infektion mit dem PRRS-Virus sind Schweine jeden Alters empfänglich (VAN DER LINDEN et al., 2003). Das klinische Erscheinungsbild variiert aber stark zwischen den Altersgruppen (VAN DER LINDEN et al., 2003). Grundsätzlich werden zwei klinische Verlaufsformen unterschieden: zum einen Reproduktionsstörungen bei adulten Schweinen (TERPSTRA et al., 1991; LADINIG et al., 2014) und zum anderen respiratorische Störungen, welche vor allem bei Aufzuchtferkeln und Mastschweinen auftreten (ROSSOW et al., 1994). PRRSV wird mit allen Sekreten und Exkreten ausgeschieden (CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 1995a; WILLS et al., 1997b) und kann sowohl vertikal (TERPSTRA et al., 1991) als auch horizontal übertragen werden (BIERK et al., 2001). In der Literatur wird die diaplazentare Infektion der Feten als bedeutender Übertragungsweg beschrieben, nicht zuletzt da intrauterin infizierte Ferkel über einen Zeitraum von 10 Wochen virämisch sein können und deshalb eine potentielle Infektionsquelle für naive Schweine darstellen (GROSSE BEILAGE et al., 2013).

Ziel der vorliegenden Studie war es, das Vorkommen von intrauterin mit PRRSV infizierten Ferkeln nach natürlicher Infektion der Muttersau zu untersuchen. Hierzu wurden präkolostrale Serumproben von Ferkeln und Serumproben der Muttersauen aus 20 randomisiert ausgewählten bayerischen Beständen sowie aus drei Beständen mit Reproduktionsstörungen durch PRRSV auf das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern gegen PRRSV und PRRSV-Genomfragmenten

untersucht.

Es wird erwartet, dass in den randomisiert ausgewählten Beständen ein sporadisches Vorkommen diaplazentarer Übertragungen beobachtet werden kann. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass in den Beständen mit Reproduktionsstörungen vermehrt intrauterine Infektionen auftreten. Zusätzlich wird angenommen, dass in diesen Beständen PRRSV-spezifische Genomfragmente im Serum der Muttertiere nachweisbar sind.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Historischer Überblick

Im Jahr 1987 kommt es in North Carolina, USA, zu epidemischen Ausbrüchen von Reproduktionsstörungen bei Sauen, Pneumonien und Kümern bei Saug- und Absetzferkeln sowie erhöhter Saugferkelmortalität unklarer Genese (KEFFABER, 1989; LOULA, 1991). Kurz darauf wird auch in Kanada und Japan von ähnlichen Epidemien berichtet (DEA et al., 1992; SHIMIZU et al., 1994). Entsprechende klinische Ausbrüche zeigen sich im November 1990 erstmals in Deutschland in der Nähe von Münster (LINDHAUS und LINDHAUS, 1991; OIE, 1992). In den folgenden Jahren wird von Fällen in den Niederlanden, Spanien, Frankreich, Großbritannien und Dänemark berichtet (WENSVOORT et al., 1991; BØTNER et al., 1994).

In den Niederlanden wird 1991 das die Erkrankung auslösende RNA-Virus isoliert (WENSVOORT et al., 1991). Es wird nach dem untersuchenden Institut Lelystad-Virus benannt (WENSVOORT et al., 1991). TERPSTRA et al. (1991) gelingt es, das Lelystad-Virus in porzinen Alveolarmakrophagen zu kultivieren, mit dem isolierten Agens erneut Sauen zu infizieren, klinische Erkrankungen auszulösen und somit die Henle-Koch-Postulate zu erfüllen. Fast zeitgleich wird in der USA der Genotyp ATCC VR-2332 identifiziert (BENFIELD et al., 1992; COLLINS et al., 1992). WENSVOORT et al. (1992) weisen durch antigenetische Vergleiche nach, dass die isolierten Viren aus Europa und den USA miteinander verwandt und auf das gleiche, antigenetisch hochvariable Virus zurückzuführen sind.

Die Herkunft dieses Virus ist bis heute nicht bekannt. Mittlerweile ist es in den meisten schweineproduzierenden Ländern endemisch verbreitet (ZIMMERMAN et al., 2012). Das RNA-Virus erhält 1991 von der EU-Kommission den einheitlichen Namen *porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV).

2. Ätiologie

2.1. Taxonomie und Morphologie

PRRSV zählt zusammen mit dem *equine arteritis virus* (EAV) der Pferde, dem *simian hemorrhagic fever virus* (SHFV) der Affen sowie dem *lactate dehydrogenase-elevating virus* (LDV) der Mäuse zur Familie der Arteriviridae innerhalb der Ordnung der Nidovirales (CONZELMANN et al., 1993; MEULENBERG et al., 1993; CAVANAGH, 1997). Der Erreger des *porcine reproductive and respiratory syndrome* ist ein behülltes Einzelstrang-RNA-Virus positiver Polarität (ZIMMERMAN et al., 2012) mit einem Durchmesser von 48-84nm (BENFIELD et al., 1992). Das Nukleokapsid selbst hat eine Größe von 25-30nm (BENFIELD et al., 1992).

Das PRRS-Virus zeichnet sich durch eine hohe Heterogenität aus (MENG, 2000) und wird in zwei Genotypen unterteilt: Genotyp 1 (EU-Typ; Prototyp: Lelystad-Virus) (WENSVOORT et al., 1991) und Genotyp 2 (NA-Typ; Prototyp: VR-2332) (BENFIELD et al., 1992), welche sich nach einer Studie von ALLENDE et al. (1999) um 63,4% in ihren Nukleotidsequenzen unterscheiden. Da PRRSV, wie alle RNA-Viren, keine zelleigenen Kontrollmechanismen besitzt, welche Spontanmutationen erkennen und korrigieren, existiert innerhalb der Genotypen eine hohe genetische Diversität (MURTAUGH et al., 2010).

2.2. Genomische Struktur

Das Genom besteht aus einer 15kb langen, polyadenylierten, einzelsträngigen, positiv polaren RNA (CONZELMANN et al., 1993) und enthält 11 bekannte, zum Teil überlappende, open reading frames (ORFs) (LUNNEY et al., 2016) (siehe Tabelle 1). ORF1a, ORF1a'-TF und ORF1b kodieren 16 Nichtstrukturproteine, inklusive der RNA-Polymerase und nehmen ungefähr 80% des Genoms ein (MEULENBERG et al., 1997; FANG et al., 2012). Die ORFs 2a bis 7 kodieren im Gegensatz dazu acht Strukturproteine, unterteilt in minor (ORFs 2a bis 4) und major structural proteins (ORFs 5 bis 7), und befinden sich am 3'-Ende des viralen Genoms (MEULENBERG et al., 1993; MEULENBERG et al., 1995; WU et al., 2001; JOHNSON et al., 2011).

Tabelle 1: ORF-kodierte Proteine nach LUNNEY et al. (2016)

5' Genomische RNA			Subgenomische mRNAs								3'
ca. 80%			ca. 20%								
ORF1a	ORF1a'-TF	ORF1b	ORF2a	ORF2b	ORF3	ORF4	ORF5	ORF5a	ORF6	ORF7	
nsp1 α + β ; nsp2-8	nsp2TF; nsp2N	nsp9-12	GP2a	E (2b)	GP3	GP4	GP5	ORF5a Protein	M	N	
Nichtstrukturproteine			Strukturproteine								

nsp = Nichtstrukturprotein, GP = Glykoprotein, M = Matrixprotein, N = Nukleokapsidprotein

Für den Nachweis von PRRSV mittels RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) wird vor allem das ORF7 verwendet, da dieses das am höchsten konservierte Gen darstellt (OLEKSIEWICZ et al., 1998; GROSSE BEILAGE et al., 2013). Das ORF5 ist ein sehr variables Gen und dient deshalb phylogenetischen Analysen (ANDREYEV et al., 1997; ZIMMERMAN et al., 2012).

3. Epidemiologie

3.1. Geographische Verbreitung

PRRSV ist in den meisten schweineproduzierenden Ländern der Welt endemisch. In Europa gelten die Schweiz (NATHUES et al., 2016), Schweden (CARLSSON et al., 2009), Finnland (VEIJALAINEN und TAPIOVAARA, 2000) und Norwegen (GRØNTVEDT et al., 2015) als PRRSV-frei.

3.2. Erregerübertragung

Die Infektion mit dem RNA-Virus kann bei Schweinen intramuskulär (YOON et al., 1999; CANO et al., 2009), intravenös (MENGELING et al., 1994), intranasal (WILLS et al., 1997b; KRANKER et al., 1998), oral (MAGAR et al., 1995), intrauterin (CHRISTIANSON et al., 1992), perkutan (BAKER et al., 2012) sowie vaginal (GRADIL et al., 1996) erfolgen. Die minimale Dosis, welche nötig ist, um eine Infektion auszulösen, hängt maßgeblich vom Übertragungsweg ab und zeigt eine Spannbreite von weniger als $10^{2,2}$ TCID₅₀/ml bei intramuskulärer Injektion, $10^{4,0}$ TCID₅₀/ml bei intranasaler und bis zu $10^{5,3}$ TCID₅₀/ml bei oraler Infektion (HERMANN et al., 2005).

Infolge einer experimentellen oronasalen Infektion kommt es innerhalb von 12 Stunden post infectionem (p.i.) zur Virämie und ein positiver Erregernachweis in der Nasenschleimhaut, in den Tonsillen und in den Makrophagen der Lunge ist möglich (ROSSOW et al., 1996a).

3.2.1. Vertikale Übertragung

PRRSV kann von infizierten Sauen diaplazentar auf deren Feten übertragen werden, was unter anderem zu fetalem Tod oder lebensschwachen Ferkeln führt (TERPSTRA et al., 1991). Die intrauterine Übertragung von PRRSV ist während allen Trächtigkeitsstadien möglich (CHRISTIANSON et al., 1993; PRIETO et al., 1996b), wird aber gehäuft im letzten Trächtigkeitsdrittel beobachtet (KRANKER et al., 1998) (siehe Unterpunkt 4.4.). Post partum kann die Übertragung von mit PRRS-Virus infizierten Sauen auf ihre Ferkel über die Milch (WAGSTROM et al., 2001; CANO et al., 2009) sowie über alle anderen Se- und Exkrete erfolgen (CHRISTIANSON et al., 1993; WILLS et al., 1997b).

3.2.2. Horizontale Übertragung

3.2.2.1. Direkte Übertragung

Das Virus wird mit allen Se- und Exkreten ausgeschieden, welche dadurch potenzielle Übertragungswege darstellen (CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 1995a; WILLS et al., 1997b). Die Ausscheidung ist in der Regel intermittierend und die Ausscheidungsdauer variiert sehr stark zwischen den Körperflüssigkeiten (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Ausscheidungsdauer von PRRSV nach experimenteller Infektion

Se- bzw. Exkret	Ausscheidungsdauer p.i.	Quellenangabe
Speichel	42 Tage	WILLS et al. (1997b)
Trachealsekret	35 Tage	WILLS et al. (1997b)
Urin	14 Tage	WILLS et al. (1997b)
Sperma	92 Tage	CHRISTOPHER-HENNINGS et al. (1995b)
Nasensekret	35 Tage	WILLS et al. (1997b)
Kot	Kein Nachweis	WILLS et al. (1997b)
	9 Tage	CHRISTIANSON et al. (1993)
	35 Tage	YOON et al. (1993)
Milch	9 Tage	WAGSTROM et al. (2001)

WILLS et al. (1997b) weisen PRRSV mittels Virusisolation 42 Tage p.i. im Speichel, 35 Tage p.i. im Trachealsekret und 14 Tage p.i. im Urin nach intranasaler Infektion nach. Des Weiteren gelingt es CHRISTOPHER-HENNINGS et al. (1995b) an Tag 92 p.i. das Virus im Sperma zu detektieren. Aus Nasensekret kann das Virus bis zum 35. Tag nach Exposition isoliert werden (WILLS et al., 1997b). Die Untersuchungen zur Ausscheidung des Erregers über den Kot kommen zu keinem einheitlichen Ergebnis: WILLS et al. (1997b) können nach experimenteller Infektion in keiner Phase das Virus im Kot finden, während CHRISTIANSON et al. (1993) PRRSV bis 9 Tage nach intranasaler Infektion von Sauen und YOON et al. (1993) über einen Zeitraum von 35 Tagen nach intranasaler Infektion von Ferkeln das *porcine reproductive and respiratory syndrome virus* mittels Virusisolation im Kot nachweisen können.

3.2.2.2. Indirekte Übertragung

Die indirekte Übertragung von PRRSV ist über belebte und unbelebte Vektoren möglich (OTAKE et al., 2003; BAKER et al., 2012). BAKER et al. (2012) können das PRRS-Virus von infizierten auf naive Schweine über ungereinigte Injektionskanülen übertragen. Auch im Zuge des intradermalen Impfens ist eine Virusübertragung nachgewiesen (BAKER et al., 2012). Ebenso stellen Transportfahrzeuge, welche nur ungenügend gereinigt, getrocknet und desinfiziert wurden, eine potentielle Infektionsquelle dar (DEE et al., 2004). Inwiefern eine aerogene Übertragung über größere Distanzen eine Infektionsgefahr birgt, ist nicht eindeutig geklärt. OTAKE et al. (2010) können infektiöses Virus in 9,1km Entfernung in Luftproben nachweisen, während FANO et al. (2005) experimentell keine aerogene Übertragung auf Sentinel-Schweine gelingt. Eine indirekte Übertragung durch Stallpersonal wird von OTAKE et al. (2002a) im Jahr 2002 genauer untersucht, mit dem Ergebnis, dass einfache Hygienemaßnahmen wie der Wechsel der Stallkleidung und Stiefel sowie das Waschen der Hände ausreicht, um die Übertragung zwischen Stallabteilen zu verhindern.

Als belebte Vektoren können *Musca domestica* (Hausfliegen) (OTAKE et al., 2003; PITKIN et al., 2009) und *Aedes vexans* (Moskitos) (OTAKE et al., 2002b) fungieren. Diese Insekten dienen dabei als rein mechanische Vektoren, da sie das PRRS-Virus in ihrem Verdauungstrakt beherbergen und auf naive Schweine übertragen können (OTAKE et al., 2002b; OTAKE et al., 2003).

4. Pathogenese

4.1. Zielzellen

Das PRRS-Virus zeigt einen sehr eingeschränkten Tropismus für Zellen der monozytären Reihe und repliziert sich primär in voll differenzierten porzinen Alveolarmakrophagen, aber auch in Makrophagen des Lymphgewebes und der Plazenta (DUAN et al., 1997a, 1997b; KARNIYCHUK et al., 2011). Des Weiteren stellen LOVING et al. (2007) fest, dass auch in dendritischen Zellen monozytärer Herkunft die Replikation des Virus möglich ist.

4.2. Allgemeine Pathogenese

Die genaue Pathogenese ist noch umstritten, aktuell hat sich das folgende Modell etabliert: Der erste Kontakt zwischen Virion und Makrophage erfolgt über das Heparansulfat-Glykosaminoglykan (HS-GAG), welches sich auf der Zelloberfläche der Target-Zelle befindet (DELPUTTE et al., 2002) und die sich anschließende Interaktion stabilisiert (DELPUTTE et al., 2005). Mittels des viralen GP5/M-Glykoproteinkomplexes bindet das Virion an den Glykoproteinrezeptor Sialoadhesin (CD169) (VANDERHEIJDEN et al., 2003; VAN BREEDAM et al., 2010). Dies führt über eine Clathrin-vermittelte Endozytose zur Aufnahme des Virus-Rezeptor-Komplexes in die Zelle (NAUWYNCK et al., 1999). Nach pH-Wert-Senkung (KREUTZ und ACKERMANN, 1996; NAUWYNCK et al., 1999) und Interaktion der viralen Membranproteine GP2a und GP4 mit dem CD163-Rezeptor (Transmembranprotein) der Makrophagen (DAS et al., 2010) kommt es zum uncoating und das Virus wird in das Zytosol entlassen (VAN GORP et al., 2008). Während der sich anschließenden Replikation wird die Zelle zunächst in einem antiapoptotischen Zustand fixiert, welcher nach der erfolgten Replikation aufgehoben wird und zum

programmierten Zelltod führt (COSTERS et al., 2008). LI et al. (2016) zeigen, dass PRRSV die Spaltung der Mitochondrien sowie die Mitophagie stimuliert, um die Replikation zu beschleunigen und die apoptotischen Prozesse der infizierten Zelle zu verhindern. Die Apoptose beschränkt sich nicht allein auf die infizierten Zellen, sondern wird auch bei nichtinfizierten Nachbarzellen beobachtet und als Bystander-Effekt beschrieben (SIRINARUMITR et al., 1998; KARNIYCHUK et al., 2011).

In einer aktuellen Studie mit CD169-Gen-knockout-Schweinen stellt sich heraus, dass eine PRRSV-Infektion bei diesen Tieren auch ohne den CD169-Rezeptor möglich ist (PRATHER et al., 2013). Des Weiteren kommen CALVERT et al. (2007) zu dem Ergebnis, dass CD163 als Hauptrezeptor fungiert und im Gegensatz zu CD169 auch allein in der Lage ist (VAN GORP et al., 2008), nichtpermissive Zellen in für PRRSV empfängliche Zellen umzuwandeln.

4.3. Aufbau und Funktion der Schweineplazenta

MOSSMAN (1987) definiert die Plazenta als intime Fusion fetaler Organe mit maternalem Gewebe zum physiologischen Austausch. Die Plazentas der Höheren Säugetiere werden anhand des Grades der Verbindung zwischen Placenta fetalis und materna in vier Arten unterteilt: epitheliochorial, syndesmochorial, endotheliochorial und hämochorial (RÜSSE, 2015). Schweine besitzen eine inkomplette, diffuse, epitheliochoriale Plazenta, welche eine klare Trennung zwischen fetalem und maternalem Anteil aufweist (RÜSSE, 2015). Es kommt lediglich zu einem Ineinandergreifen der fetalen und maternalen Mikrovilli (Semiplacenta) (KARNIYCHUK und NAUWYNCK, 2013). Maternale Antikörper können diese stabile Barriere, bestehend aus sechs Schichten, nicht durchdringen (ŠTERZL et al., 1966). Deshalb ist es wichtig, dass Ferkel nach ihrer Geburt mit Kolostrum versorgt werden, da es als erste Quelle für Antikörper dient (KRUSE, 1983). Die Feten werden im Uterus vor allem histiotroph mithilfe der Uterindrüsen ernährt, was durch die große Diffusionsfläche aufgrund des gefalteten Chorions begünstigt wird (RÜSSE, 2015). Die hämotrophe Versorgung und der Gasaustausch ist an speziellen Arealen an der Spitze sowie an den lateralen Seiten der Chorionzotten möglich, aufgrund der dort vorhandenen Fenestrierung

des Kapillarendothels (maternal und fetal) sowie der Verschmelzung der Basalmembran des Uterusepithels mit der Basalmembran der maternalen Kapillaren (MOSSMAN, 1987; RÜSSE, 2015). Infolgedessen ist die Plazentarschranke an diesen Stellen nur noch circa 2µm dick, eine Passage maternaler Immunglobuline ist trotzdem nicht möglich (RÜSSE, 2015).

4.4. Pathogenese der Reproduktionsstörungen

Die pathophysiologische Rolle von PRRSV in Bezug auf die beobachteten Reproduktionsstörungen ist noch umstritten. Das Virus erreicht das Endometrium wahrscheinlich über Makrophagen und repliziert sich in den dort ansässigen CD169⁺/CD163⁺-Makrophagen (KARNIYCHUK et al., 2011; KARNIYCHUK und NAUWYNCK, 2013). Anschließend gelangt PRRSV in die fetale Plazenta, infiziert fetale Makrophagen und kann sich nun im sich entwickelnden Fetus ausbreiten (KARNIYCHUK et al., 2011). Wie das Virus diese sechslagige Barriere – welche die porcine Plazenta darstellt – durchdringt, ist noch unklar, jedoch mutmaßen KARNIYCHUK et al. (2011), dass ihm dies mit maternalen Makrophagen gelingt. Sie zeigen im Jahr 2012, dass beim Schwein Mikrochimärismus auftritt, was einen möglichen Weg der interfetalen sowie maternal-fetalen Übertragung von Virionen darstellen könnte (KARNIYCHUK et al., 2012b). Auch nach intraperitonealer Injektion humaner Zellen in Schweinefeten, werden diese im Blut sowie in diversen Organen der Geschwister nachgewiesen (MCCONICO et al., 2011).

Es wird gezeigt, dass die Menge der vorhandenen CD169⁺/CD163⁺-Makrophagen im Endometrium sowie in der Plazenta am Ende der Trächtigkeit am höchsten ist, wohingegen CD169⁻/CD163⁺-Makrophagen ein konstantes Level aufweisen (KARNIYCHUK und NAUWYNCK, 2009). Dies könnte erklären, warum es bei einer PRRSV-Infektion tragender Sauen vor allem gegen Ende der Trächtigkeit zur intrauterinen Infektion der Feten kommt (KARNIYCHUK und NAUWYNCK, 2009), obwohl Feten jederzeit empfänglich für PRRSV sind (CHRISTIANSON et al., 1993).

Nach experimenteller Infektion von Sauen am 90. Trächtigkeitstag (TT) beobachten KARNIYCHUK et al. (2011) den programmierten Tod PRRSV-positiver Zellen sowie PRRSV-negativer Nachbarzellen an fetalen Implantationsstellen. Da makroskopisch keine Läsionen in den fetalen Organen gefunden werden, sehen sie die Degeneration der fetalen Plazenta mit nachfolgender fokaler Ablösung des fetalen Allantochorion vom Uterusepithel als Grund für die Reproduktionsstörungen (LAGER und HALBUR, 1996; ROSSOW et al., 1996b; KARNIYCHUK et al., 2012a). Im Gegensatz dazu sind LADINIG et al. (2015) der Ansicht, dass im Fetus stattfindende Prozesse wie die Virusreplikation sowie die sich anschließende laterale Übertragung zwischen nebeneinanderliegenden Feten die ausschlaggebenden Ursachen für fetalen Tod sind.

4.5. Pathogenese im Fetus

Da die fetalen Organe reich an CD169⁺/CD163⁺-Makrophagen sind, stellen diese eine ideale Umgebung für die Replikation von PRRSV dar (KARNIYCHUK und NAUWYNCK, 2009). Einmal im Fetus angekommen repliziert sich das Virus in vielen Organen (Lunge, Leber, Niere, Herz, Gehirn, Milz), vor allem aber in lymphatischen Geweben mit dem Thymus als Primärorgan (CHEON und CHAE, 2000, 2001; ROWLAND, 2010; HAN et al., 2013). LADINIG et al. (2014) zeigen, dass die Virusmenge im Endometrium positiv mit der Virusmenge im fetalen Thymus und Serum korreliert. Nach experimenteller Infektion mit PRRSV Genotyp 2 kann auch in Endothelzellen der Arteriolen der Lunge (ROSSOW et al., 1996b) und Kapillaren des Herzens, kardialen Myozyten sowie in Epithelzellen des Thymus virales Antigen nachgewiesen werden (CHEON und CHAE, 2000).

Ferkel, die eine intrauterine Infektion überlebt haben, können an Thymusatrophie, -apoptose (FENG et al., 2002; HAN et al., 2013; LI et al., 2014), Thymozytendepletion sowie Suppression der CD4⁺-T-Lymphozyten mit gegengleichem Anstieg der CD8⁺-T-Lymphozyten (FENG et al., 2002) und Veränderung der Leukozyten-Subpopulationen im peripheren Blut leiden (FENG et al., 2002; NIELSEN et al., 2003). FENG et al. (2002) beobachten eine Gewichtsreduktion des Thymus von bis zu 50% bei Geburt und gehen davon aus, dass dies in Kombination

mit den Veränderungen der T-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut zu einer Immunsuppression der neugeborenen Ferkel führt. Warum manche Feten die intrauterine Infektion überleben und andere daran sterben ist nicht geklärt, auch die Anzahl infizierter Ferkel innerhalb eines Wurfes sowie deren Lage zueinander im Uterus ist stark variabel (LADINIG et al., 2014).

5. Klinisches Erscheinungsbild

Die Ausprägung des klinischen Erscheinungsbildes variiert von asymptomatisch bis verheerend und ist abhängig von vielen Faktoren, wie der Virulenz des Virusisolates (HALBUR et al., 1996a; TIAN et al., 2007), dem Immunstatus der Tiere (WENSVOORT, 1993), dem Herdenmanagement, Koinfektionen (THACKER et al., 1999; HARMS et al., 2001) sowie dem Alter der betroffenen Tiere (VAN DER LINDEN et al., 2003).

Wenn PRRSV erstmalig in einem Bestand oder in Form eines neuen Isolates mit geringer Kreuzprotektivität in einem infizierten Bestand auftritt, kann es, in Abhängigkeit von der Virulenz des Isolates, zu einem epidemischem Verlauf mit Klinik in allen Produktionsstufen kommen (TIAN et al., 2007; ZIMMERMAN et al., 2012). Schwach virulente Isolate können im Gegensatz dazu subklinische oder endemische Herdeninfektionen hervorrufen (HALBUR et al., 1996a). Endemische Verlaufsformen werden außerdem in Herden beobachtet, welche eine Immunität gegenüber homologen PRRSV-Isolaten aufgebaut haben (ZIMMERMAN et al., 2012).

5.1. Reproduktionsstörungen

Die Infektion mit dem PRRS-Virus kann zu Reproduktionsstörungen in der frühen sowie der späten Phase der Trächtigkeit führen (ALBINA et al., 1992; LADINIG et al., 2014). In der Frühträchtigkeit ist Fruchttod beschrieben (PRIETO et al., 1997a), während es gegen Ende der Trächtigkeit zur klinischen Manifestation mit Spätaborten, verkürzten Trächtigkeiten, mumifizierten Ferkeln, fetalem Tod, lebensschwachen, von Geburt an infizierten Ferkeln und damit verbundener erhöhter Sterblichkeit der Saugferkel sowie klinisch unauffälligen Ferkeln kommen

kann (TERPSTRA et al., 1991; STEVENSON et al., 1993; MENGELING et al., 1994). Auch vermehrt umrauschende Sauen (ALEXOPOULOS et al., 2005), verlängerte Tragezeiten sowie eine verzögerte Rückkehr in den Östrus (TERPSTRA et al., 1991) werden beschrieben. Abgesehen davon reicht das klinische Erscheinungsbild infizierter Sauen von ungestörtem Allgemeinbefinden (BØTNER et al., 1994; MENGELING et al., 1994; KRANKER et al., 1998) bis hin zu Apathie und Inappetenz (PLANA et al., 1992), Fieber, abdominal betonter Tachypnoe und blauroter Verfärbung der Ohren und der Vulva (TERPSTRA et al., 1991; ROSSOW, 1998; LI et al., 2007).

Infolge einer PRRS-Erkrankung von Ebern kann es, neben den klassischen Anzeichen einer systemischen Erkrankung wie Anorexie, Lethargie (YAEGER et al., 1993) und erhöhter Körperinnentemperatur (YAEGER et al., 1993; CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 1995b), zur Reduktion der Samenqualität kommen (PRIETO et al., 1996a). PRIETO et al. (1996a) beobachteten 2-10 Wochen nach der intranasalen Infektion von Ebern Veränderungen der Spermien, verringerte Spermienmotilität und akrosomale Defekte. Auch nach natürlicher Infektion von Ebern wird eine Zunahme von Spermatozoen mit Akrosomendefekten beschrieben (SCHULZE et al., 2013). SWENSON et al. (1994) und YAEGER et al. (1993) können nach intranasaler Infektion nur eine Verringerung des Volumens des Ejakulates sowie eine Erhöhung des pH-Wertes, jedoch keine Veränderung der Spermienmotilität oder der -morphologie feststellen. Wohingegen SCHULZE et al. (2013) im Ejakulatvolumen, in der Spermakonzentration und in der Motilität keine signifikanten Unterschiede zwischen ante und post infectionem finden. Als relevant ist die Möglichkeit der Übertragung von PRRSV über das Sperma auf naive Sauen und die sich daran anschließende Verbreitung von PRRSV im Betrieb zu sehen (PRIETO et al., 1997b; NATHUES et al., 2016).

5.2. Respiratorische Störungen

Bei Absetzferkeln und Masttieren ähnelt die Infektion mit PRRSV anderen respiratorischen Erkrankungen (THACKER, 2001). Sie ist durch erhöhte Körperinnentemperatur, Niesen, Husten, Dyspnoe, Lethargie (ROSSOW et al., 1994), verminderte Tageszunahmen (KLINGE et al., 2009) und

vermehrte bakterielle sowie virale Koinfektionen (WILLS et al., 2000; HARMS et al., 2001) charakterisiert. Auch ist PRRSV am porcine respiratory disease complex (PRDC) beteiligt (THACKER, 2001).

Die Ausprägung einer akuten PRRSV-Infektion bei Saugferkeln zeigt sich vielfältig: TERPSTRA et al. (1991) beschreiben Apathie, Blässe, Schwäche, vereinzelt Muskelzittern, Grätschen und respiratorische Störungen nach intrauterinen Infektionen. Auch Anorexie, Zyanosen (STEVENSON et al., 1993), Fieber (POL et al., 1991), Diarrhoe (ROSSOW, 1998), periokuläre Ödeme, zentralnervöse Störungen (ROSSOW et al., 1999) sowie deutlich erhöhte Mortalitätsraten (TERPSTRA et al., 1991) von bis zu 60% werden beobachtet (ZIMMERMAN et al., 2012).

6. Diagnostik

Der Verdacht einer Erkrankung durch PRRSV wird mithilfe der Anamnese, des klinischen Erscheinungsbildes sowie pathomorphologischen und -histologischen Veränderungen gestellt (ZIMMERMAN et al., 2012). Zur Bestätigung des Verdachtes ist immer ein direkter Erregernachweis erforderlich (ZIMMERMAN et al., 2012).

6.1. Pathologische Veränderungen

Makroskopisch zeigen sich postnatal häufig moderate, multifokale, hellbraune Konsolidierungen des Lungenparenchyms sowie Hyperplasie der lokalen Lymphknoten (HALBUR et al., 1995; ROSSOW, 1998). Eine interstitielle Pneumonie, Proliferation der Typ II Pneumozyten sowie Infiltration mononukleärer Zellen und Makrophagen in die Alveolarsepten, in Kombination mit nekrotischem Zelldebris innerhalb der Alveolen, lassen sich mikroskopisch feststellen (HALBUR et al., 1995; BEYER et al., 2000). In lymphatischen Geweben (Lymphknoten, Tonsillen, Milz) ist eine lymphoide Hyperplasie mit fokalen Nekrosen sowie eine mittelgradige, multifokale, perivaskuläre, lymphohistiozytäre Myokarditis des Herzens beschrieben (HALBUR et al., 1995).

Innerhalb eines Wurfes intrauterin infizierter Ferkel werden postpartal oft verschiedene klinische Ausprägungen bei den Ferkel beobachtet: lebensfähige, klinisch unauffällige Ferkel, lebensschwache Ferkel, mit

Mekonium und Amnionflüssigkeit gefärbte Ferkel, autolytische Ferkel sowie partiell und vollständig mumifizierte Feten (LAGER und HALBUR, 1996; LADINIG et al., 2014) (siehe Abbildung 1).



Quelle: Klinik für Schweine

Abbildung 1: Unterschiedlich weit entwickelte totgeborene Ferkel innerhalb eines Wurfes nach PRRSV-Infektion der Muttersau

LAGER und HALBUR (1996) beschreiben Ödeme und ausgedehnte Einblutungen in die Nabelschnur, perirenale, perisplenale und mesenteriale Ödeme sowie Hydrothorax und Hydroperitoneum bei Feten. Als mikroskopisch sichtbare fetale Läsionen werden nekrotisierende Arteritis mit periarteriellen Hämorrhagien des *Funiculus umbilicalis*, milde periportale Hepatitis (LAGER und HALBUR, 1996), Leukenzephalitis, Myokarditis mit Verlust von Myofibrillen (ROSSOW et al., 1996b) und multifokale interstitielle Pneumonie mit Proliferation der Typ II Pneumozyten (SUR et al., 1996; HAN et al., 2013) beschrieben.

Perivaskuläre lymphohistiozytäre Endometritis und Myometritis mit Ödemen werden bei natürlich sowie experimentell infizierten Sauen beobachtet (STOCKHOFE-ZURWIEDEN et al., 1993; LAGER und HALBUR, 1996; LADINIG et al., 2015). Vaskulitis und multifokale Mikroseparationen der epithelialen Schichten von Plazenta und Uterus können mikroskopisch gesehen werden (STOCKHOFE-ZURWIEDEN et

al., 1993; LAGER und HALBUR, 1996).

6.2. Direkter Erregernachweis

Als Probenmaterial für einen direkten Erregernachweis eignen sich Serumproben, oral fluid samples (OFS) (WILLS et al., 1997b), bronchoalveolar lavage fluid (BALF), Tonsillenproben, Lymphknoten, Lungengewebe, oropharyngeale Geschabsel (HORTER et al., 2002), Fleischsaft (GROSSE BEILAGE et al., 2013) und Spermaproben (CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 1995a).

Für den Nachweis des PRRS-Virus stehen folgende Verfahren zur Verfügung: Immunhistochemie (IHC) (MAGAR et al., 1993; HALBUR et al., 1995; ROSSOW et al., 1996a), direct fluorescent antibody (dFA) an gefrorenen Lungen (BENFIELD et al., 1992; ROSSOW et al., 1995; HALBUR et al., 1996b) sowie die Virusisolierung mithilfe von Zellkulturen (WENSVOORT et al., 1991; KIM et al., 1993). Der Nachweis spezifischer PRRSV-Genomfragmente ist möglich über In-situ-Hybridisierung (ISH) (LAROCHELLE et al., 1996; SUR et al., 1996), RT-PCR (MARDASSI et al., 1994; SUAREZ et al., 1994; VAN WOENSEL et al., 1994; CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 1995a; OLEKSIEWICZ et al., 1998) und real-time RT-PCR (SPAGNUOLO-WEAVER et al., 2000; EGLI et al., 2001; KLEIBOEKER et al., 2005).

Die RT-PCR ist das Mittel der Wahl in der Routinediagnostik, wobei zwischen nested RT-PCR (SHIN et al., 1998), one-step RT-PCR (EGLI et al., 2001), real-time RT-PCR (KLEIBOEKER et al., 2005) und multiplex RT-PCR (ZHANG et al., 2015) unterschieden wird. WENSVOORT et al. (1991) gelingt die Virusisolation in porzinen Alveolarmakrophagen und PROVOST et al. (2012) die Isolation in St. Jude Porcine Lung Cells (SJPL). Andere nicht-porzine Zelllinien, welche einen kompletten Replikationszyklus des PRRS-Virus ermöglichen, sind MARC-145 und CL-2621 Zellen (Subklone der MA-104 Nierenzellen afrikanischer Affen) (BENFIELD et al., 1992; BAUTISTA et al., 1993).

Mithilfe der Virusisolation können ROSSOW et al. (1995) bereits 12h post infectionem Virus im Serum nachweisen während dies erst nach 24h mittels PCR möglich ist (REICKS et al., 2006). Die Dauer der Virämie korreliert auffällig mit dem Alter des infizierten Tieres. Bei postpartal infizierten Ferkeln kann eine Virämie über einen Zeitraum von 21 bis 35 Tagen nachgewiesen werden (YOON et al., 1993; DUAN et al., 1997a; WILLS et al., 1997a). Intrauterin infizierte Ferkel haben eine auffällig längere Virämiephase von bis zu 10 Wochen (WOESTE und GROSSE BEILAGE, 2007). Im Gegensatz dazu sind adulte Schweine häufig nur bis zu 2 Wochen virämisch (MENGELING et al., 1994; CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 1995b). Nach Beendigung der Virämie kann das Virus in Lymphknoten bis zu 8,5 Monate mittels RT-PCR nachgewiesen werden (WILLS et al., 2003).

6.3. Direkter Erregernachweis im totgeborenen Ferkel

CHEON und CHAE (2000) untersuchen Organe von sieben abortierten und sechs totgeborenen Ferkeln mittels RT-PCR, Virusisolation, IHC und ISH. Diese starben infolge einer natürlichen intrauterinen Infektion mit Genotyp 2 (CHEON & CHAE, 2000). Das PRRS-Virus wird in Lunge, Thymus, Leber, Tonsille, Milz, Herz, Niere, Mediastinal- und Beckenlymphknoten nachgewiesen, davon am häufigsten in der Milz (CHEON und CHAE, 2000). Ein Jahr später wiederholen sie die Untersuchung fetaler Organe, dieses Mal nach experimenteller Infektion der Muttersau und weisen das Virus vor allem in Thymus, Tonsille und Mediastinallymphknoten nach (CHEON und CHAE, 2001). HAN et al. (2013) kommen zu vergleichbaren Ergebnissen nach experimenteller Infektion von Sauen mit Genotyp 1. Mittels real-time RT-PCR und ISH gelingt ihnen der Nachweis viraler RNA im fetalen Thymus, Tonsille, Lunge und Inguinallymphknoten, davon am häufigsten im Thymus (HAN et al., 2013).

LADINIG et al. (2014) betonen, dass große Mengen viraler RNA vor allem im Thymus, im Serum und im Endometrium Mekonium-gefärbter Ferkel detektiert werden können und empfehlen diese Ferkel für diagnostische Zwecke zu beproben (siehe Abbildung 2).



Quelle: Klinik für Schweine

Abbildung 2: Zwei totgeborene Mekonium-gefärbte Ferkel der Sau 2.11 aus Bestand 22

6.4. Indirekter Erregernachweis

Die Serologie wird vor allem genutzt um den Status von ungeimpften Herden zu ermitteln, da nicht zwischen Impfantikörpern, maternalen Antikörpern oder Antikörpern durch Feldinfektionen unterschieden werden kann (YOON et al., 2003; ZIMMERMAN et al., 2012). Nur der Nachweis einer Serokonversion ungeimpfter Schweine von negativ zu positiv kann zum Nachweis von PRRSV-Infektionen verwendet werden, weshalb nach Möglichkeit gepaarte Serumproben entnommen werden sollten (VAN ALSTINE et al., 1993; YOON et al., 2003).

In der Routinediagnostik wird als serologisches Nachweisverfahren ein enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) durchgeführt (ALBINA et al., 1992). Als Standardtest wird dafür der HerdChek[®] X3 PRRS ELISA (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, USA) verwendet (COLLINS et al., 1996; ZIMMERMAN et al., 2012). Mittels des ELISAs können sowohl Antikörper gegen Genotyp 1 als auch gegen Genotyp 2 erfasst, jedoch nicht differenziert werden (PLAGEMANN, 2006). Zur Differenzierung der Antikörper wurden verschiedene Verfahren entwickelt, ein blocking-

ELISA (SØRENSEN et al., 1998) sowie ein indirekter ELISA basierend auf rekombinantem N-Protein, welches durch *Escherichia coli* exprimiert wird (SEUBERLICH et al., 2002).

Andere serologische Testverfahren sind der indirect fluorescent antibody test (IFAT) (YOON et al., 1992), der Serumneutralisationstest (SNT) (YOON et al., 1994), die Immunchromatographie (LI et al., 2017) sowie der immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) (WENSVOORT et al., 1991; DREW et al., 1995).

Laut YOON et al. (1995) können IgG-Antikörper mittels ELISA schon 9-13 Tage p.i. nachgewiesen werden. Sie erreichen um den 28.-42. Tag p.i. die höchsten Titer (YOON et al., 1995), sinken danach stetig ab und sind in der Regel ab dem 4.-10. Monat p.i. nicht mehr detektierbar (YOON et al., 2003). Es gibt aber auch Tiere, die schon nach 4-6 Monaten serologisch negativ sind (GROSSE BEILAGE et al., 2013). Mehrfacher Kontakt zu einem homologen Isolat, zum Beispiel in Folge einer Vakzination, führt häufig nicht mehr zu einem nachweisbaren Antikörperanstieg (GROSSE BEILAGE et al., 2013).

7. Impfung

In Deutschland sind Anfang des Jahres 2017 fünf modifizierte, attenuierte Lebendimpfstoffe (modified-live virus, MLV) sowie ein Totimpfstoff (killed virus, KV) zugelassen (PAUL-EHRLICH-INSTITUT, 2017) (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: PRRSV-Impfstoffe mit gültiger Zulassung in Deutschland (PAUL-EHRLICH-INSTITUT, 2017)

	Attenuierte Lebendimpfstoffe					Totimpfstoff
Bezeichnung Impfstoff	Porcilis® PRRS	Ingelvac PRRSFLEX® EU	Ingelvac® PRRS MLV	Unistrain® PRRS	ReproCyc® PRRS EU	Progressis®
Zulassungsinhaber	Intervet Deutschland GmbH	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH	Laboratorios S.A., HIPRA, Spanien	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH	MERIAL GmbH
Genotyp	Genotyp 1	Genotyp 1	Genotyp 2	Genotyp 1	Genotyp 1	Genotyp 1

7.1. Lebendimpfstoffe

Attenuierte Lebendimpfstoffe sind wichtig, um Infektionen in endemischen Herden zu reduzieren und klinische Ausbrüche zu vermeiden (PEJSAK und MARKOWSKA-DANIEL, 2006). PRRSV-MLV-Impfstoffe induzieren eine protektive Immunität gegenüber homologen Isolaten (LAGER et al., 1999; ZUCKERMANN et al., 2007). Der vermittelte Impfschutz gegenüber heterologen Isolaten variiert stark (LAGER et al., 1999; SCORTTI et al., 2006b; CANO et al., 2007a).

Die Vorteile der Impfung von Mastschweinen mit einem Lebendimpfstoff zeigen sich in der Reduktion klinischer Anzeichen einer Erkrankung, verbesserten Tageszunahmen (CANO et al., 2007a; CANO et al., 2007b; PARK et al., 2014), der Verminderung von Lungenläsionen (MENGELING et al., 2003; CHARERNTANTANAKUL et al., 2006; LAGER et al., 2014; PARK et al., 2014) sowie einer verkürzten Virämiedauer (LAGER et al., 2014) und Virusausscheidung (LINHARES et al., 2012; LAGER et al., 2014). Eine Infektion mit PRRSV und sich daran anschließende Erregerausscheidung kann aber nicht verhindert werden (CANO et al., 2007a; CANO et al., 2007b).

Die Effekte einer Vakzination von Sauen werden kontrovers diskutiert: SCORTTI et al. (2006b) beschreiben, dass eine Sauenimpfung mit attenuierten Lebendimpfstoffen die Reproduktionsleistung verbessert. Die Anzahl totgeborener und virämischer sowie während der Säugezeit verendeter Ferkel wird deutlich verringert, die Tageszunahmen erhöht und das Auftreten virämischer Sauen kann verhindert werden (SCORTTI et al., 2006b). Die diaplazentare Übertragung von Virus nach Infektion wird aber nicht verhindert (SCORTTI et al., 2006b). Auch in endemisch infizierten Sauenherden hat eine MLV-Vakzination positive Auswirkungen auf viele Reproduktionsparameter (ALEXOPOULOS et al., 2005). Nach der Impfung sinkt die Zahl umrauschender Sauen, die Abferkelrate steigt und es werden weniger verkürzte Trächtigkeiten und mehr lebendgeborene und abgesetzte Ferkel beobachtet (ALEXOPOULOS et al., 2005; PEJSAK und MARKOWSKA-DANIEL, 2006; OLANRATMANEE et al., 2014). PEJSAK und MARKOWSKA-DANIEL (2006) können mithilfe eines MLV-Impfstoffes auf Genotyp 1-Basis eine

Verbesserung der Reproduktionsparameter zu allen Zeitpunkten der Trächtigkeit erreichen. Im Gegensatz dazu beobachten DEWEY et al. (1999), dass der Reproduktionsstatus der Sauen zum Zeitpunkt der Impfung (MLV-Impfstoff Genotyp 2) entscheidend ist. Sie weisen in einer Studie nach, dass nach Impfung tragender Sauen mit MLV-Vakzinen, vor allem im Zeitraum der letzten vier Wochen der Trächtigkeit, weniger lebendgeborene und abgesetzte Ferkel und mehr Mumien sowie totgeborene Ferkel auftreten (DEWEY et al., 1999).

Im Anschluss an die Vakzination mit einem attenuierten Lebendimpfstoff repliziert sich das Impfvirus im Schwein, wodurch die Möglichkeit einer Mutation des Impfvirus mit sich daran anschließenden klinischen Ausbrüchen besteht (BØTNER et al., 1997; STORGAARD et al., 1999; NIELSEN et al., 2001). Außerdem können intrauterine Übertragungen von Impfvirus auf ungeborene Feten (MENGELING et al., 1996; SCORTTI et al., 2006a) sowie horizontale Übertragungen auf naive Tiere auftreten (BØTNER et al., 1997).

7.2. Totimpfstoffe

Inaktivierte Impfstoffe sind vor allem für tragende Sauen entwickelt und führen in homologen Challengeversuchen zu verschiedenen Ergebnissen: PLANA-DURAN et al. (1997) beobachten bei den mit Totimpfstoffen vakzinierten Sauen eine Verminderung der Reproduktionsstörungen nach experimenteller Infektion. Im Gegensatz dazu können ZUCKERMANN et al. (2007) keine Ausbildung einer protektiven Immunität nachweisen. Auch liefern KV-Impfstoffe keinen Impfschutz gegenüber heterologen Isolaten (SCORTTI et al., 2007). Trotz Verabreichung einer KV-Vakzine kommt es nach Infektion der Sauen mit einem Feldvirus zu klinischen PRRS-Ausbrüchen charakterisiert durch Anorexie und Ohrrandzyanosen, Virämie sowie diaplazentarer Übertragung auf die Feten, wohingegen die Zahl der abgesetzten Ferkel ansteigt (SCORTTI et al., 2007). Nach längerem Einsatz in endemisch infizierten Sauenherden werden positive Effekte auf diverse Reproduktionsparameter, wie zum Beispiel weniger Aborte und mehr lebendgeborene und abgesetzte Ferkel, beschrieben (PAPATSIROS et al., 2006).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Vorkommen intrauteriner Infektionen von Schweinefeten mit PRRSV auf Feldebene in bayerischen Ferkelerzeugerbetrieben retrospektiv zu erfassen. Zusätzlich wurden Ferkel von Beständen mit PRRSV-bedingten Reproduktionsstörungen auf diaplazentare Übertragung von PRRS-Virus untersucht.

2. Auswahl der untersuchten Bestände und Studientiere

Im Rahmen dieser Studie wurden Proben von 228 Sauen und 767 Ferkeln aus 23 Beständen untersucht. Diese Bestände wurden in zwei Gruppen unterteilt. Der Gruppe 1 wurden die Bestände 1-20 zugeordnet und der Gruppe 2 die Bestände 21-23.

2.1. Gruppe 1

Bestände

Die Blutproben der Gruppe 1 stammten aus einem genehmigten Tierversuch (Aktenzeichen: 55.2.-154-2532.2-16-13) und wurden in der Zeit von November 2013 bis September 2014 entnommen. Die zugrunde liegenden Bestände wurden in Form einer zweistufigen Klumpenstichprobe (basierend auf der Anzahl ferkelerzeugender Betriebe pro bayerischen Regierungsbezirk und Anzahl gesamtuntersuchter Bestände) aus einem Pool von 36 freiwillig an der Studie teilnehmenden Bestände aus allen Regierungsbezirken Bayerns randomisiert ausgewählt. Infolgedessen wurden 20 Bestände (6 Bestände aus Niederbayern, 2 Bestände aus Oberbayern, je 3 Bestände aus der Oberpfalz und Mittelfranken, jeweils 2 Bestände aus Unterfranken und Schwaben sowie 1 Bestand aus Oberfranken) in die Studie eingeschlossen. Von den Betrieben wurden relevante Betriebsdaten mithilfe eines Fragebogens erfasst und dokumentiert.

Durchschnittlich wurden in den Beständen der Gruppe 1 288 Sauen gehalten (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Studienbetriebe Gruppe 1, geografische Lage der Bestände, PRRSV-Impfstatus der Sauen, Zuchtsauen und Anzahl der untersuchten Schweine pro Bestand

Bestand	Regierungs- bezirk	PRRSV- Impfstatus	Zuchtsauen im Bestand	Beprobte Sauen	Beprobte Ferkel
1	Schwaben	Genotyp 2	840	9	27
2	Niederbayern	Genotyp 2	600	10	30
3	Oberbayern	Genotyp 1	300	10	30
4	Niederbayern	ungeimpft	300	10	30
5	Mittelfranken	Genotyp 1	240	10	30
6	Niederbayern	Genotyp 1	265	10	30
7	Oberbayern	Genotyp 2	195	10	30
8	Niederbayern	Genotyp 1	270	10	30
9	Oberbayern	Genotyp 1	220	10	30
10	Oberpfalz	ungeimpft	150	10	30
11	Oberpfalz	ungeimpft	220	10	30
12	Mittelfranken	Genotyp 1	250	10	30
13	Oberpfalz	ungeimpft	250	10	30
14	Niederbayern	ungeimpft	210	10	30
15	Niederbayern	Genotyp 1	300	10	30
16	Mittelfranken	ungeimpft	230	10	29
17	Schwaben	Genotyp 2	100	9	27
18	Oberfranken	ungeimpft	300	10	29
19	Unterfranken	ungeimpft	230	10	28
20	Unterfranken	ungeimpft	290	10	30
Σ	Bayern	-	Ø288	198	590

Impfstatus in Bezug auf PRRSV

Das Vakzinationsschema wurde von allen 20 Beständen erfasst. Anhand des Impfregimes der Sauen bezüglich PRRSV wurden die Bestände in neun Nichtimpfbetriebe und elf Impfbetriebe unterteilt. Ebenso wurde der verwendete Impfstoff dokumentiert. Porcilis® PRRS (Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) wurde in fünf Betrieben, Ingelvac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland) in vier Betrieben und Unistrain® PRRS (Laboratorios HIPRA, S.A., Amer, Spanien) in zwei Betrieben angewandt (siehe Tabelle 5). In Betrieb 4 wurden alleinig die Ferkel in der dritten Lebenswoche gegen PRRSV vakziniert. Dieser Bestand wurde aufgrund der ungeimpften Muttersauen als Nichtimpfbetrieb eingestuft.

Tabelle 5: Verwendeter PRRSV-Impfstoff zur Vakzination der Sauen in den 20 Beständen der Gruppe 1 (x=zutreffendes Impfregime)

Bestand	Keine Impfung	Verwendeter Impfstoff		
		Porcilis® PRRS	Ingelvac® PRRS MLV	Unistrain® PRRS
1			x	
2			x	
3		x		
4	x			
5				x
6		x		
7			x	
8		x		
9		x		
10	x			
11	x			
12				x
13	x			
14	x			
15		x		
16	x			
17			x	
18	x			
19	x			
20	x			

Studientiere

Es lagen 198 Blutproben von Sauen und 590 Blutproben von Ferkeln aus den Beständen 1-20 zur Untersuchung vor. Die Anzahl der vorliegenden Proben aus den Beständen ist Tabelle 4 zu entnehmen. Die Anzahl von insgesamt 40 Proben pro Bestand wurde für den Tierversuch, in dessen Zuge die Proben entnommen wurden, statistisch berechnet und erlaubte mit einem Konfidenzintervall von über 98%, dass es erkannt worden wäre, wenn die Prävalenz einer Erkrankung mindestens 10% betragen hätte.

2.2. Gruppe 2**Bestände**

Die zweite Gruppe bestand aus den Beständen 21-23. Diese Bestände hatten zum Zeitpunkt der Probenentnahme Reproduktionsstörungen (Aborte, Mumien, lebensschwache Ferkel) sowie einen aktuellen Nachweis von PRRSV. Bestand 21 und Bestand 23 befanden sich in

Bayern (Niederbayern und Schwaben) und Bestand 22 in Nordrhein-Westfalen (Coesfeld). Die Blutproben wurden zu diagnostischen Zwecken im Zeitraum von Februar bis Juni 2016 entnommen. Auch von diesen Beständen wurden relevante Betriebsdaten mithilfe eines Fragebogens erfasst und dokumentiert. Durchschnittlich wurden in den drei Beständen 253 Sauen gehalten (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Studienbetriebe Gruppe 2, geografische Lage der Bestände, PRRSV-Impfstatus der Sauen, Zuchtsauen und Anzahl der untersuchten Schweine pro Bestand

Bestand	Regierungs- bezirk/ Landkreis	PRRSV- Impfstatus	Zuchtsauen im Bestand	Beprobte Sauen	Beprobte lebende/tote Ferkel
21	Niederbayern	ungeimpft	100	10	30/6
22	Coesfeld	Genotyp 2	500	10	60/13
23	Schwaben	Genotyp 2	160	10	60/8
Σ	-	-	Ø253	30	150/27

Bestand 21 galt bis zum PRRS-Ausbruch 2016 als unverdächtig. In der Abferkelung vor der Beprobung zeigten sich Spätaborte, verkürzte Trächtigkeiten sowie erhöhte Saugferkelmortalitätszahlen. Aufgrund dessen hatte der bestandsbetreuende Tierarzt Blutproben entnommen und bei Sauen Genomfragmente des PRRSV Genotyp 1 mittels PCR sowie Antikörper mittels ELISA im Blut nachweisen können. Auch im Bestand 22 kam es zu Spätaborten, lebensschwachen Ferkeln und erhöhter Saugferkelmortalität sowie respiratorischen Störungen in der Mast. In den entnommenen Blutproben konnten PRRSV-Genomfragmente des Genotyp 1 mittels PCR bei Saugferkeln, Sauen und Mastschweinen nachgewiesen werden. Diese Bestände wurden als Bestände mit epidemischen PRRS-Ausbrüchen deklariert. Im Bestand 23 traten sporadisch Spätaborte auf und bei verstorbenen Saugferkeln und Masttieren konnte eine Infektion mit PRRSV Genotyp 1 nachgewiesen werden. Dieser Bestand wurde als endemisch infiziert eingestuft.

Impfstatus in Bezug auf PRRS

Die Bestände der Gruppe 2 wurden anhand des Impfregimes der Sauen bezüglich PRRSV unterteilt. Es gab zwei Impfbetriebe und einen Nichtimpfbetrieb. Beide Impfbetriebe vakzinierten ihre Muttersauen mit Ingelvac® PRRS MLV (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Verwendeter PRRSV-Impfstoff zur Vakzination der Sauen in den 3 Beständen der Gruppe 2 (x=zutreffendes Impfregime)

Bestand	Keine Impfung	Verwendeter Impfstoff		
		Porcilis® PRRS	Ingelvac® PRRS MLV	Unistain® PRRS
21	x			
22			x	
23			x	

Studientiere

In jedem Bestand wurden von 10 Muttersauen aus der gleichen Abferkelgruppe Blutproben entnommen. Pro Sau wurden jeweils drei (Betrieb 21) beziehungsweise sechs Ferkel (Bestände 22 und 23) beprobt. Es wurde versucht, vor allem von lebensschwachen Ferkeln Proben zu entnehmen. Des Weiteren wurden totgeborene, während des Aufenthalts auf dem Betrieb verstorbene und erdrückte Ferkel sowie Mumien untersucht. Insgesamt wurden Blutproben von 30 Sauen, 150 Ferkeln sowie Organmaterial von 27 toten Ferkeln zur Diagnostik verwendet.

3. Gewinnung der Blutproben

Am Tag des errechneten Abferkeltermins wurde in den Betrieben die Abferkelung überwacht, damit die Serumproben der Ferkel direkt nach der Geburt und somit noch präkolostral gewonnen werden konnten. Die Blutprobenentnahme bei den Muttersauen erfolgte nach der Geburt, um die Abferkelung nicht zu stören.

3.1. Sauen

Die Blutprobenentnahme bei den Sauen fand post partum statt. Um eine Fixation zu vermeiden, wurden die Sauen zur Blutprobenentnahme durch eine Hilfsperson mit Berührungen und Ansprache im Kastenstand abgelenkt. Nur wenn dies nicht den gewünschten Erfolg erzielte, wurden die Sauen kurzzeitig mit einer Oberkieferschlinge fixiert. Die Blutentnahme erfolgte aus der *Vena jugularis externa dextra* mittels einer Serummonovette (Primavette® V Serum 10ml, Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) sowie einer sterilen Einmalkanüle (1,2x100mm, SUPRA®, Erhardt-Söhne GmbH, Geislingen, Deutschland) unter Aspiration.

3.2. Ferkel

Die Blutprobenentnahme bei den Saugferkeln erfolgte direkt nach der Geburt, vor der Kolostrumaufnahme. Dafür wurden die Ferkel von einer Hilfsperson in Rückenlage auf dem Schoß fixiert. Von einer zweiten Person wurde der Kopf gehalten und gleichzeitig aus der *Vena cava cranialis* mithilfe einer Monovette (Primavette® V Serum 7,5ml, Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) und einer sterilen Einmalkanüle (0,8x40mm, Sterican®, Braun Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz) unter Aspiration Blut entnommen. Die Einstichstelle befand sich circa 5mm rechts des *Manubrium sterni* und direkt vor der ersten Rippe.

4. Erfassung der Paritäten

Von allen in die Studie eingeschlossenen Sauen wurde die Wurfzahl erfasst. Die Paritäten wurden in Wurfgruppen zusammengeschlossen. Jungsau (Paritätsgruppe 1) waren Sauen, welche zum ersten Mal geferkelt haben. Als Altsau (Paritätsgruppe 2) wurden Sauen mit dem zweiten bis vierten Wurf und als alte Altsau (Paritätsgruppe 3) Sauen mit mehr als vier Würfen bezeichnet. Die Ferkel wurden der jeweiligen Paritätsgruppe der Muttersau zugeordnet.

5. Tote Ferkel

Des Weiteren wurden totgeborene Ferkel und Mumien, Ferkel die lebensschwach geboren wurden und während des Aufenthalts auf dem Bestand verstarben sowie erdrückte Ferkel von den Beständen 21 bis 23 zur Diagnostik mitgenommen. Sie wurden einzeln in Plastikbeutel verpackt und mit der Sauennummer zur späteren Zuordnungsbarkeit beschriftet. Für jedes Ferkel wurde vermerkt, ob es tot zur Welt kam (lebensfähig, Mekonium-gefärbt, autolytisch, Mumie) oder im Verlauf des Aufenthalts in dem Bestand gestorben ist. In Betrieb 22 gebar eine Sau (Sau 22.11) während des Aufenthalts nur tote Ferkel (siehe Abbildung 1 und Abbildung 2). Von diesen wurden vier zur weiteren Untersuchung mitgenommen.

6. Verarbeitung und Lagerung der Proben

Die Serummonovetten wurden im Labor der Klinik für Schweine der Ludwig-Maximilians-Universität München für 10 Minuten bei 20°C und 1560g zentrifugiert (Rotanta 460R Zentrifuge, Andreas Hettich® GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland). Anschließend wurde das überstehende Serum, je nach Menge, in zwei bis drei Reaktionsgefäße mit einem Fassungsvermögen von 1,5ml (Eppendorf® Safe-Lock Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert.

Des Weiteren wurden jeweils von drei Ferkeln pro Sau Serumpoolproben hergestellt. Hierfür wurden von jedem Ferkel 200µl Serum in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf® Safe-Lock Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert und mittels Vortexmischer vermischt.

Alle Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C tiefgefroren.

Die toten Ferkel wurden in der Klinik für Schweine ebenfalls bis zur Entnahme der Organproben bei -20°C tiefgefroren. Später wurde jedes dieser Ferkel im Institut der Tierpathologie der LMU München seziiert und wenn möglich, eine Probe folgender Organe entnommen: Thymus, Tonsille, Lunge, Leber, Milz, Niere, Gehirn. Des Weiteren wurde jeweils ein Tupfer der Pleura entnommen. Alle Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C tiefgefroren.

7. Labordiagnostische Untersuchungen

7.1. Serologische Untersuchungen

Die serologische Untersuchung der Serumproben wurde im Labor der Klinik für Schweine der LMU München durchgeführt. Für die Untersuchung auf Antikörper gegen das PRRS-Virus wurde das IDEXX® PRRS X3 Testkit (IDEXX Switzerland AG, Liebefeld-Bern, Schweiz) verwendet. Dies ist ein indirekter ELISA zum Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper in Plasma- oder Serumproben von Schweinen.

Zunächst wurden die Proben sowie eine Negativ- und eine Positivkontrolle in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit rekombinantem Virus-Antigen beschichtet waren. Während der Inkubationszeit banden sich die in der Probe enthaltenen PRRSV-spezifischen Antikörper an die Antigene und bildeten mit ihnen einen Komplex. Nun folgten 3-5 Waschschriffe während derer ungebundenes Material entfernt wurde. Durch Zugabe eines Anti-Schwein-IgG-Meerretichperoxidase-Konjugats wurden die in den Vertiefungen haftenden Antikörper gebunden und nach einer erneuten Inkubation abermals mit 3-5 Waschschriffen ungebundenes Konjugat entfernt. Zuletzt wurde ein Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat hinzugefügt, welches durch die an die Anti-Schwein-IgG gebundene Meerretichperoxidase in einen photometrisch messbaren Farbstoff umgewandelt wurde. Hierbei war die Farbentwicklung proportional zu der Menge spezifisch-bindender Anti-PRRSV-Antikörper.

Zur Auswertung wurde von jeder Probe das Verhältnis Probe/Positive-Kontrolle (P/PK) bestimmt. Bei einem Verhältnis unter 0,40 wurde die Probe als negativ für Antikörper gegen das PRRS-Virus betrachtet. Werte größer oder gleich 0,40 wurden als positiv gewertet. Positive Ferkel wurden wiederholt beprobt.

Die Durchführung des ELISAs erfolgte mittels eines Thunderbolt™-Pipettierautomaten (Goldstandard Diagnostics, Davis, CA, USA).

7.2. Molekularbiologische Untersuchungen

7.2.1. Extraktion viraler RNA aus Serum

Die molekularbiologische Untersuchung der gewonnenen Serumproben auf PRRSV-spezifische Genomfragmente erfolgte im Labor des Lehrstuhls für Virologie des Instituts für Infektionskrankheiten und Zoonosen der Tierärztlichen Fakultät der LMU München mittels real-time RT-PCR. Die Serumproben der Sauen wurden einzeln und die der Ferkel zunächst in Dreierpoolproben untersucht und bei positivem Befund aufgelöst und erneut mittels real-time RT-PCR beprobt.

Zur Extraktion der viralen RNA wurden das kommerziell erhältliche High Pure Viral Testkit (F. Hoffmann- La Roche AG, Basel, Schweiz) sowie der Pipettierroboter Microlab[®] Star^{Let} (Hamilton Life Science Robotics GmbH, Martinsried, Deutschland) verwendet. Im Falle einer Wiederholungsuntersuchung fraglicher Proben wurde die Extraktion manuell mit dem High Pure Viral RNA Kit (F. Hoffmann- La Roche AG, Basel, Schweiz) nach Herstellerangaben durchgeführt.

7.2.2. Extraktion viraler RNA aus fetalen Organen

Die molekularbiologische Untersuchung der entnommenen Organproben auf PRRSV-spezifische Genomfragmente erfolgte ebenfalls im Labor des Lehrstuhls für Virologie mittels real-time RT-PCR. Von jedem Ferkel wurden jeweils eine Probe des Thymus und eine der Tonsillen untersucht.

Zunächst wurde Organmaterial steril in ein 2ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf[®] Safe-Lock Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt. Danach wurden 400µl RLT-Puffer, 4µl β-ME sowie eine Stahlkugel hinzugefügt und die Probe für 1min bei 25Hz in der Laborschwingmühle (Schwingmühle MM300, Retsch[®] GmbH, Haan, Deutschland) homogenisiert. Die sich anschließende Extraktion der viralen RNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem kommerziell erhältlichen RNeasy[®] Mini Kits (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland).

7.2.3. PCR

Der Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente erfolgte nach dem von KLEIBOEKER et al. (2005) beschriebenen Protokoll mittels einer real-time (*TaqMan*) RT-PCR. Diese wird auch in der Routinediagnostik im Lehrstuhl für Virologie angewandt, da sie eine simultane Detektierung sowie Differenzierung zwischen Genotyp 1 und Genotyp 2 ermöglicht. Für die Amplifizierung der extrahierten PRRSV-RNA wurde das QuantiTect® Probe RT-PCR Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Der Mastermix wurde nach Herstellerangaben hergestellt und je Reaktion 20µl Mastermix und 5µl Nukleinsäureextrakt in eine Vertiefung des PCR-Kits pipettiert. Die PCR fand in einem Thermocycler (Stratagene MX3000® bzw. Stratagene MX3005®, Agilent Technologies, Santa Clara, United States) statt und wurde nach dem in Tabelle 8 dargestellten Temperaturprotokoll durchgeführt.

Tabelle 8: Temperaturprotokoll der durchgeführten real-time RT-PCR nach KLEIBOEKER et al. (2005), modifiziert

Zyklen	Aktivität	Temperatur	Zeit
1x	Reverse Transkription	50°C	30min
1x	Polymeraseaktivierung	95°C	15min
42x	Denaturierung	94°C	30sec
42x	Primer-Anlagerung, Elongation, Messung	60°C	1min

Die eingesetzten Primer (siehe Tabelle 9) sowie die Sonden (siehe Tabelle 10) basierten auf dem hochkonservierten ORF7 und wurden in ihrer Nukleotidsequenz modifiziert.

Tabelle 9: Für die real-time RT-PCR verwendete Primer* (KLEIBOEKER et al., 2005)

Genotyp	Primer	Sequenz
PRRSV Genotyp 1	Vorwärtsprimer	5'-GCA CCA CCT CAC CCR RAC-3'
	Rückwärtsprimer	5'-CAG TTC CTG CRC CYT GAT-3'
PRRSV Genotyp 2	Vorwärtsprimer 1	5'-ATG ATG RGC TGG CAT TCT-3'
	Vorwärtsprimer 2	5'-ATR ATG RGC TGG CAT TCC-3'
	Rückwärtsprimer	5'-ACA CGG TCG CCC TAA TTG-3'

*fett-markierte Nukleotide weichen von den publizierten Sequenzen ab

Tabelle 10: Für die real-time RT-PCR verwendete TaqMan-Sonden* (KLEIBOEKER et al., 2005)

Sonde	Fluorophor	Sequenz	Quencher
PRRSV Genotyp 1	5'-6-FAM-	CCTCTG YY TGCAATCGATCCAGAC	-BHQ1-3'
PRRSV Genotyp 2	5'-HEX-	TGTGGTGAATGGCACTGATTGACA	-BHQ2-3'

*fett-markierte Nukleotide weichen von den publizierten Sequenz ab

Zur Auswertung der gemessenen Ergebnisse wurde die Stratagene MxPro Software der Thermocycler verwendet. Cycle threshold-Werte (Ct-Werte) unter 30 wurden als positiv und Ct-Werte größer gleich 30 und kleiner als 35 wurden als schwach positiv eingestuft. Ein Ct-Wert zwischen 35 und 40 wurde als fraglich eingestuft und die Probe wiederholt untersucht. Wenn die zweite Untersuchung wieder einen Ct-Wert unter 40 ergab, wurde die Probe als positiv deklariert. Ct-Werte größer gleich 40 galten als negativ (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Einstufung der mittels real-time PCR ermittelten Ct-Werte

Ct-Wert	Einstufung
< 30	Positiv
≥ 30 und < 35	Schwach positiv
≥ 35 und < 40	Fraglich, erneute Untersuchung
≥ 40	Negativ

7.2.4. Sequenzierung

Im Falle des Nachweises von PRRSV-spezifischen Genomfragmenten wurde jeweils eine positive Probe des Bestandes an das Labor der IVD GmbH (Gesellschaft für innovative Veterinärdiagnostik, Hannover) geschickt. Hierfür wurde jeweils die Probe mit dem niedrigsten Ct-Wert ausgewählt. In dem Labor der IVD GmbH erfolgte die Sequenzierung sowie die Interpretation der Nukleotidsequenzanalyse des ORF5 und das Alignment der Referenzstämme. Ab einer Sequenzidentität von kleiner gleich 98% zu den Referenzsequenzen wurde das gewonnene Isolat als Feldstamm eingestuft.

8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit IBM SPSS® Statistics Version 23.0 (Fa. IBM Corp., Armonk, USA). Zur Erstellung deskriptiver Grafiken wurde Microsoft Excel® 2010 (Fa. Microsoft, Redmond, USA) verwendet.

Primäres Untersuchungsziel war die Häufigkeit des Nachweises von PRRSV-RNA in präkolostralen Seren oder in Thymus und Tonsillen von toten Saugferkeln. In einem weiteren Schritt sollte überprüft werden, inwieweit der PRRSV-Status der neugeborenen Ferkel mit dem Infektionsstatus der zugehörigen Muttertiere korrelierte. Aufgrund der geringen Nachweisrate von PRRSV-RNA in den präkolostralen Seren, den Organen der toten Saugferkel sowie den Seren der Muttertiere wurden die Ergebnisse der labordiagnostischen Untersuchungen deskriptiv dargestellt und keine Korrelationen berechnet. Die Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Muttertiere wurden mittels Kreuztabellen und Chi²-Test nach Pearson auf eine Korrelation mit der Paritätsgruppe der jeweiligen Muttersau untersucht. Das Signifikanzniveau für den durchgeführten Test lag bei 5% ($p < 0,05$).

IV. ERGEBNISSE

1. Gruppe 1

1.1. Paritäten und Zuordnung der Ferkel

Die Anzahl der Sauen pro Paritätsgruppe sowie die zugehörigen Ferkel sind in Tabelle 12 dargestellt. Von den 198 beprobten Sauen wurden 11,1% (22/198) der Paritätsgruppe 1 und je 44,4% (88/198) den Paritätsgruppen 2 und 3 zugeordnet.

Dementsprechend wurden auch die 590 Ferkel der jeweiligen Paritätsgruppe der Muttersau zugeteilt. Somit waren 11,2% (66/590) der untersuchten Ferkel von Jungsauen und je 44,4% (262/590) der untersuchten Ferkel von Altsauen und alten Altsauen.

Tabelle 12: Einteilung der Sauen (n=198) der Bestände 1-20 nach Paritätsgruppen und Zuordnung der Ferkel (n=590)

Paritätsgruppe	Muttersauen		Ferkel	
	(n)	%	(n)	%
Jungsau	22	11,1	66	11,2
2.-4.Wurf	88	44,4	262	44,4
≥ 5. Wurf	88	44,4	262	44,4
Σ	198	100	590	100

1.2. Serologische Untersuchung

1.2.1. Sauen

1.2.1.1. Einzeltiere

Die 198 vorhandenen Serumproben der Muttersauen wurden mittels ELISA auf PRRSV-spezifische Antikörper untersucht. Ab einem P/PK-Verhältnis größer oder gleich 0,4 galten die Proben als positiv für das Vorhandensein von Antikörpern gegen PRRSV. Zum Beprobungszeitpunkt konnten bei 49,5% (98/198) der Sauen PRRSV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

1.2.1.2. Auswertung auf Bestandsebene

Antikörper gegen PRRSV waren in 13 von 20 Beständen nachweisbar. Die Anzahl seropositiver Sauen innerhalb der Bestände variierte zwischen minimal 1 von 10 und maximal 10 von 10 der untersuchten Sauen. Die Verteilung der seropositiven und seronegativen Sauen in den einzelnen Beständen kann Abbildung 3 entnommen werden. Innerhalb der 13 Bestände mit positivem Antikörpernachweis waren 76,6% (98/128) der Sauen seropositiv.

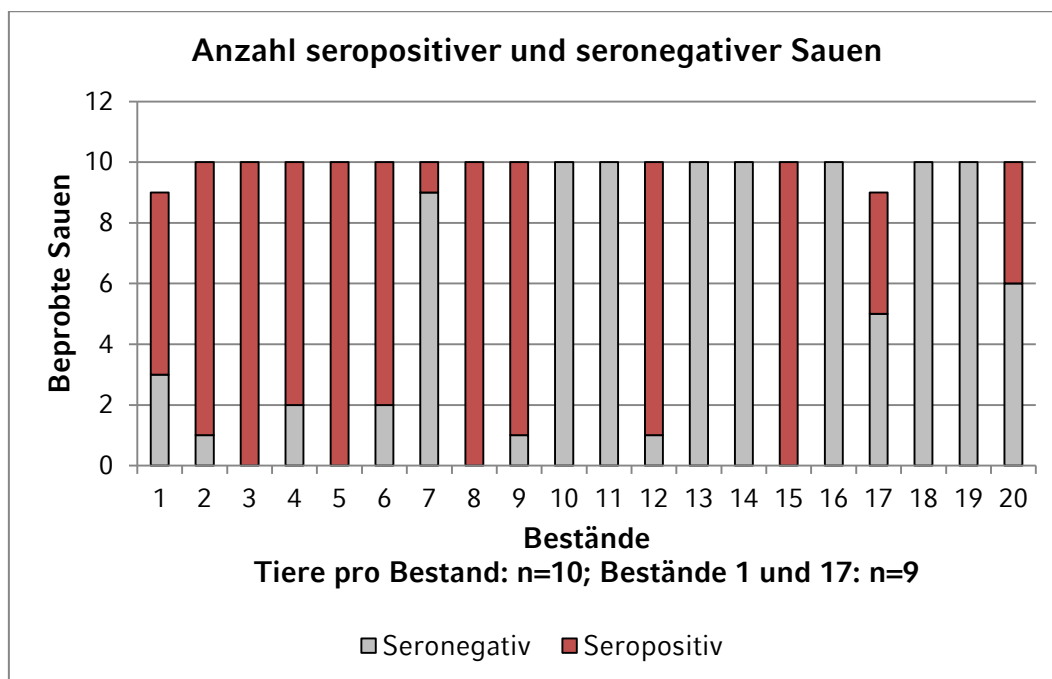


Abbildung 3: Verteilung der seropositiven sowie der seronegativen Sauen (n=198) der Gruppe 1 auf den Beständen

1.2.1.3. Auswertung nach Impfstatus

Von allen 20 Beständen wurde das Vakzinationsschema der Sauen gegen PRRSV erfasst und anhand dessen die Bestände in geimpfte und ungeimpfte Bestände unterteilt. In 11 Beständen wurden die Zuchtsauen gegen PRRSV geimpft. In Bestand 4 wurden nur die Ferkel gegen PRRSV vakziniert. Dieser Bestand wurde anhand der ungeimpften Muttersauen als Nichtimpfbetrieb eingestuft. Somit wurden 54,5% (108/198) der 198 Muttersauen geimpft (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Serumproben der Muttersauen (n=198) aus Gruppe 1 auf PRRSV-spezifische Antikörper unterteilt nach Impfstatus

Impfstatus	ELISA	Muttersauen	
		(n)	%
Geimpft	Positiv	86	79,6
	Negativ	22	20,4
	Σ	108	100
Ungeimpft	Positiv	12	13,3
	Negativ	78	86,7
	Σ	90	100

In Abbildung 4 ist die Anzahl der seropositiven sowie der seronegativen Sauen in den einzelnen Beständen, unterteilt nach dem Impfstatus, dargestellt. Die Häufigkeit seropositiver Sauen innerhalb der Impfbetriebe variierte zwischen minimal 1 von 10 und maximal 10 von 10 der untersuchten Sauen. In 79,6% (86/108) der Serumproben der geimpften Muttersauen waren PRRSV-spezifische Antikörper nachweisbar (siehe Tabelle 13).

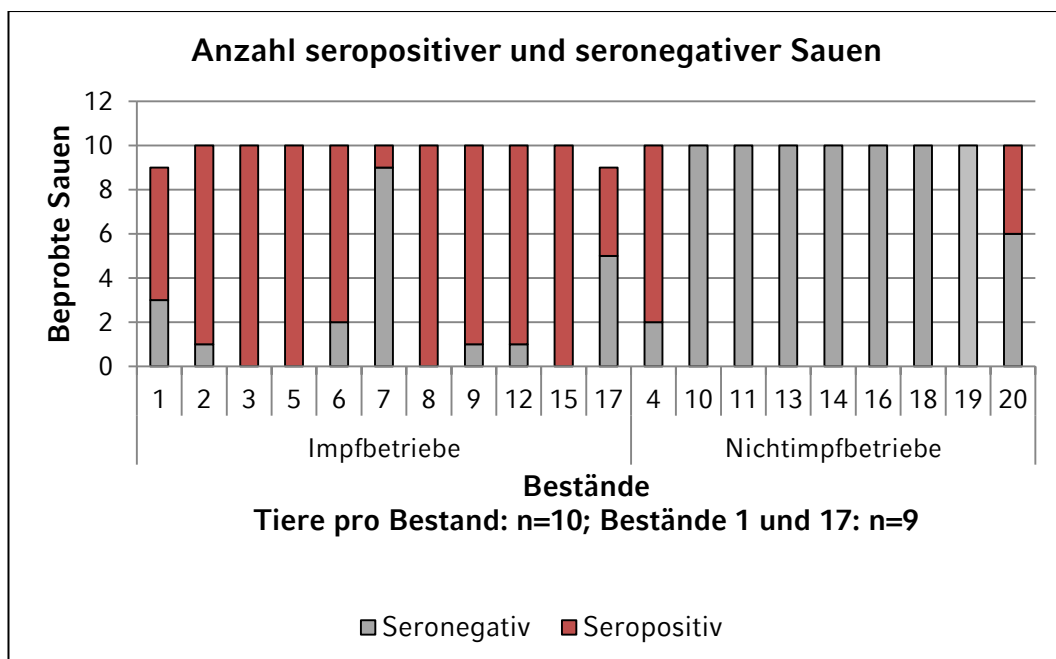


Abbildung 4: Anzahl seropositiver sowie seronegativer Sauen (n=198) aus Gruppe 1 in den einzelnen Beständen unterteilt nach Impfstatus

Die Anzahl seropositiver Sauen innerhalb der Nichtimpfbetriebe variierte zwischen minimal 4 von 10 und maximal 8 von 10 der untersuchten Sauen. Hier waren in 13,3% (12/90) der Serumproben der ungeimpften Muttersauen PRRSV-spezifische Antikörper nachweisbar (siehe Tabelle 13). Diese 12 Sauen stammten aus zwei Nichtimpfbetrieben (Betrieb 4

und Betrieb 20). Innerhalb der seropositiven Nichtimpfbetriebe wurden 12 der 20 untersuchten Sauen positiv auf Antikörper gegen PRRSV getestet (siehe Tabelle 13).

1.2.1.4. Auswertung nach Parität

Von jeder der 198 Sauen wurde die Parität erfasst und die Sau anhand derer einer der drei Paritätsgruppen zugeordnet. In Tabelle 12 ist die Verteilung der Muttersauen und deren Ferkel auf die Paritätsgruppen dargestellt.

Von den untersuchten Jungsauen war die Hälfte (11/22) zum Zeitpunkt der Probenentnahme seropositiv, von den Altsauen waren es 39,8% (35/88). In 59,1% (52/88) der Serumproben der alten Altsauen konnten PRRSV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Es waren tendenziell mehr Sauen aus der Paritätsgruppe 3 seropositiv als aus der Paritätsgruppe 2 ($p=0,058$).

Tabelle 14: Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Serumproben der Muttersauen (n=198) aus Gruppe 1 auf PRRSV-spezifische Antikörper unterteilt nach Parität

ELISA	Paritätsgruppe					
	Jungsauen		2.-4. Wurf		≥ 5. Wurf	
	(n)	%	(n)	%	(n)	%
Positiv	11	50,0	35	39,8	52	59,1
Negativ	11	50,0	53	60,2	36	40,9
Σ	22	100	88	100	88	100

Zusätzlich zu den Paritätsgruppen wurden die Sauen nach Impfstatus unterteilt (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Ergebnisse der serologischen Untersuchung auf PRRSV-spezifische Antikörper der Serumproben der Muttersauen (n=198) aus Gruppe 1 unterteilt nach Impfstatus und Paritätsgruppe

Impfstatus	ELISA	Paritätsgruppe					
		Jungsauen		2.-4. Wurf		≥ 5. Wurf	
		(n)	%	(n)	%	(n)	%
Geimpft	Positiv	10	90,9	34	69,4	42	87,5
	Negativ	1	9,1	15	30,6	6	12,5
	Σ	11	100	49	100	48	100
Ungeimpft	Positiv	1	9,1	1	2,6	10	25
	Negativ	10	90,9	38	97,4	30	75
	Σ	11	100	39	100	40	100

1.2.2. Ferkel

Alle 590 präkolostralen Proben, welche für die retrospektive Untersuchung vorlagen, wurden serologisch mittels ELISA auf PRRSV-spezifische Antikörper untersucht. Keine der Proben war im ELISA reaktiv. Somit konnten zum Zeitpunkt der Beprobung bei keinem der Ferkel Antikörper gegen PRRSV im Blut nachgewiesen werden.

1.3. Molekularbiologische Untersuchung

1.3.1. Sauen

Die 198 Serumproben der Sauen der randomisiert ausgewählten Bestände wurden mittels real-time RT-PCR auf PRRSV-spezifische Genomfragmente molekularbiologisch untersucht. In keiner der untersuchten Serumproben wurden PRRSV-spezifische Genomfragmente detektiert.

1.3.2. Ferkel

Alle vorhandenen 590 Ferkelseren wurden molekularbiologisch mittels real-time RT-PCR auf PRRSV-spezifische Genomfragmente untersucht. Ein positiver PRRSV-Nachweis gelang aus keiner der untersuchten Serumproben. Somit konnte für keines der Ferkel zum Zeitpunkt der Geburt eine Virämie nachgewiesen werden.

2. Gruppe 2

2.1. Paritäten und Zuordnung der Ferkel zu den Sauen

Zum Zeitpunkt des Einschlusses hatten die Sauen in den Beständen der Gruppe 2 Paritäten zwischen dem zweiten und dem elften Wurf. Die Anzahl der Sauen pro Paritätsgruppe sowie die zugehörigen Ferkel sind in Tabelle 16 dargestellt. Von den 30 beprobten Sauen wurden 43,3% (13/30) der Paritätsgruppe 2 und 56,7% (17/30) der Paritätsgruppe 3 zugeordnet. Auf den Beständen 21-23 wurden keine Jungsauern beprobt, da sie bei Ankunft auf dem Bestand entweder schon abgeferkelt hatten oder während des Aufenthalts nicht in Geburt kamen.

Dementsprechend wurden auch die 150 Ferkel der jeweiligen Paritätsgruppe der Muttersau zugeteilt. Somit waren 44% (66/150) der Ferkel von Altsauen und 56% (84/150) der Ferkel von alten Altsauen.

Tabelle 16: Einteilung der Sauen (n=30) der Bestände 21-23 nach Paritätsgruppen und Zuordnung der Ferkel (n=150)

Paritätsgruppe	Muttersauen		Ferkel	
	(n)	%	(n)	%
Jungsau	0	0	0	0
2.-4. Wurf	13	43,3	66	44
≥ 5. Wurf	17	56,7	84	56
Σ	30	100	150	100

2.2. Serologische Untersuchung

2.2.1. Sauen

2.2.1.1. Einzeltiere

Alle 30 entnommenen Serumproben der Muttersauen wurden mittels ELISA auf PRRSV-spezifische Antikörper untersucht. Ab einem P/PK-Verhältnis größer oder gleich 0,4 galten die Proben als positiv für das Vorhandensein von Antikörpern gegen PRRSV. Zum Beprobungszeitpunkt konnten bei 90% (27/30) der Sauen PRRSV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

2.2.1.2. Auswertung auf Bestandsebene

Antikörper gegen PRRSV waren in allen drei Beständen nachweisbar. Die beprobten Sauen der Bestände 21 und 22 waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme alle seropositiv, während in Bestand 23 nur bei 7 der 10 untersuchten Sauen PRRSV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden konnten.

2.2.1.3. Auswertung nach Impfstatus

Von den Beständen 21-23 wurde das Vakzinationsschema der Sauen gegen PRRSV erfasst und anhand dessen die Bestände in Impf- und Nichtimpfbetriebe unterteilt. In zwei Beständen wurden die Zuchtsauen gegen PRRSV geimpft. Somit waren 66,7% (20/30) der Muttersauen vakziniert.

Die Häufigkeit seropositiver Sauen innerhalb der Impfbetriebe variierte zwischen minimal 7 von 10 und maximal 10 von 10 der untersuchten Sauen. In 17 von 20 Serumproben der geimpften Muttersauen waren PRRSV-spezifische Antikörper nachweisbar. Die Anzahl seropositiver Sauen innerhalb des Nichtimpfbetriebs lag bei 10 von 10 der untersuchten Sauen (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Serumproben der Muttersauen (n=30) aus Gruppe 2 auf PRRSV-spezifische Antikörper unterteilt nach Impfstatus

Impfstatus	ELISA	Muttersauen	
		(n)	%
Geimpft	Positiv	17	85
	Negativ	3	15
	Σ	20	100
Ungeimpft	Positiv	10	100
	Negativ	0	0
	Σ	10	100

2.2.1.4. Auswertung nach Parität

Von jeder der 30 Sauen aus den Beständen der Gruppe 2 wurde die Parität erfasst und die Sauen anhand derer den drei Paritätsgruppen zugeordnet. In Tabelle 16 ist die Verteilung der Muttersauen sowie der Ferkel auf die Paritätsgruppen dargestellt.

Von den untersuchten Altsauen waren 10 von 13 seropositiv und bei allen alten Altsauen konnten PRRSV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Jungsauen wurden auf den Beständen 21-23 nicht beprobt (siehe Tabelle 18). Es waren tendenziell mehr Sauen aus der Paritätsgruppe 3 seropositiv als aus der Paritätsgruppe 2 ($p=0,07$).

Tabelle 18: Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Serumproben der Muttersauen (n=30) aus Gruppe 2 auf PRRSV-spezifische Antikörper unterteilt nach Parität

ELISA	Paritätsgruppe			
	2.-4. Wurf		≥ 5 . Wurf	
	(n)	%	(n)	%
Positiv	10	76,9	17	100
Negativ	3	23,1	0	0
Σ	13	100	17	100

Zusätzlich zu den Paritätsgruppen wurden die Sauen der Gruppe 2 nach ihrem Impfstatus unterteilt (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Serumproben der Muttersauen (n=30) aus Gruppe 2 auf PRRSV-spezifische Antikörper unterteilt nach Impfstatus und Paritätsgruppe

Impfstatus	ELISA	Paritätsgruppe			
		2.-4. Wurf		≥ 5. Wurf	
		(n)	%	(n)	%
Geimpft	Positiv	6	66,7	11	100
	Negativ	3	33,3	0	0
	Σ	9	100	11	100
Ungeimpft	Positiv	4	100	6	100
	Negativ	0	0	0	0
	Σ	4	100	6	100

2.2.2. Ferkel

Alle 150 Ferkelseren wurden mittels ELISA auf PRRSV-spezifische Antikörper untersucht. Zum Beprobungszeitpunkt konnten bei 1,3% (2/150) der untersuchten Ferkel PRRSV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Beide Ferkel waren aus Bestand 21, einem Nichtimpfbetrieb, und stammten aus dem gleichen Wurf (Wurf 9).

2.3. Molekularbiologische Untersuchung

2.3.1. Sauen

Von den 30 beprobten Sauen wurden die entnommenen Serumproben molekularbiologisch mittels real-time RT-PCR auf PRRSV-spezifische Genomfragmente untersucht. In keiner der untersuchten Serumproben wurden PRRSV-spezifische Genomfragmente detektiert. Somit konnte bei keiner der Sauen der Betriebe 21-23 eine Virämie zum Beprobungszeitpunkt nachgewiesen werden.

2.3.2. Ferkel

Insgesamt wurden 177 Ferkel auf den drei Beständen der Gruppe 2 beprobt. Davon waren 150 Ferkel lebendgeborene und 27 totgeborene, erdrückte oder während des Aufenthalts verstorbene Ferkel. Von den toten Ferkeln wurden Thymus und Tonsillen mittels PCR auf PRRSV-Genomfragmente untersucht. Es waren 13% (23/177) der lebendgeborenen und toten Ferkel molekularbiologisch PRRSV-positiv.

Im Bestand 21 waren 16,7% (6/36) der untersuchten Ferkel PRRSV-positiv. In 21,9% (16/73) der untersuchten lebendgeborenen und toten Ferkel aus Bestand 22 konnten PRRSV-Genomfragmente nachgewiesen werden. Innerhalb der beprobten Ferkel des Bestands 23 waren 1,5% (1/68) molekularbiologisch positiv. In Abbildung 5 ist die Anzahl der PRRSV-positiven sowie PRRSV-negativen Ferkel auf den einzelnen Beständen unterteilt nach Organ- und Serumproben dargestellt.

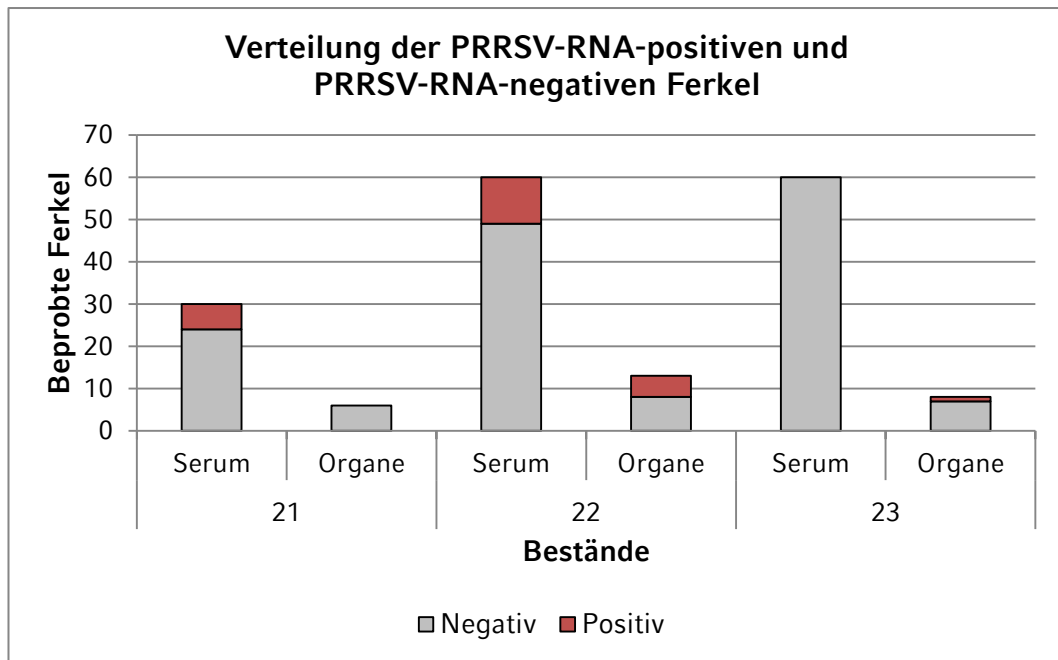


Abbildung 5: Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung der Serum- und Organproben der Ferkel (n=177) aus Gruppe 2 auf PRRSV-spezifische Genomfragmente

2.3.2.1. Lebendgeborene Ferkel

2.3.2.1.1. Einzeltiere

Insgesamt wurden 150 präkolostral gewonnene Serumproben der Ferkel molekularbiologisch mittels real-time RT-PCR auf PRRSV-spezifische Genomfragmente untersucht. In 11,3% (17/150) der Serumproben konnten PRRSV-spezifische Genomfragmente des Genotyp 1 detektiert werden. In keiner der Serumproben konnten Genomfragmente des PRRSV Genotyp 2 nachgewiesen werden.

2.3.2.1.2. Auswertung auf Bestandsebene

Mittels real-time RT-PCR konnten Genomfragmente des PRRS-Virus in Ferkelseren aus 2 von 3 Beständen (Bestand 21 und Bestand 22) detektiert werden. Bezogen auf die 2 positiven Bestände waren 18,9% (17/90) der Ferkel virämisch. Innerhalb des Bestands 21 waren 20% (6/30) der untersuchten Ferkel PRRSV-positiv und innerhalb des Bestands 22 waren es 18,3% (11/60) der untersuchten Ferkel. In keinem der 60 Ferkelseren aus Bestand 23 konnten PRRSV-spezifische Genomfragmente nachgewiesen werden.

2.3.2.1.3. Auswertung nach Würfen

Bezogen auf die beiden positiven Bestände waren Ferkel aus 6 von 20 Würfen positiv. Innerhalb der Bestände 21 und 22 konnten bei Ferkeln aus jeweils 3 von 10 Würfen PRRSV-spezifische Genomfragmente detektiert werden (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7). Die Häufigkeit PCR-positiver Ferkel innerhalb der 10 untersuchten Würfe des Bestands 21 variierte zwischen minimal 1 von 3 und maximal 3 von 3 der untersuchten Ferkel (siehe Abbildung 6).

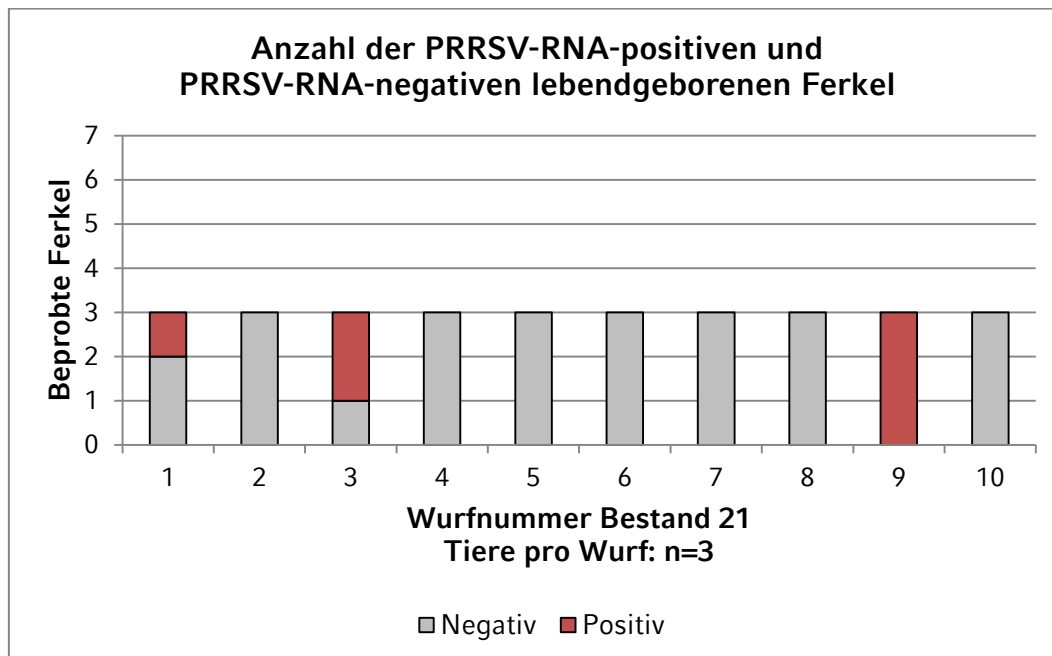


Abbildung 6: Verteilung der im Serum PRRSV-RNA-positiven und PRRSV-RNA-negativen lebendgeborenen Ferkel (n=30) des Bestands 21 auf Wurfebene

In Abbildung 7 ist die Verteilung PCR-positiver und PCR-negativer Ferkel innerhalb der 10 untersuchten Würfe des Bestands 22 dargestellt. Die Häufigkeit präkolostral virämischer Ferkel variierte zwischen minimal 1 von 6 und maximal 5 von 6 der untersuchten Ferkel.

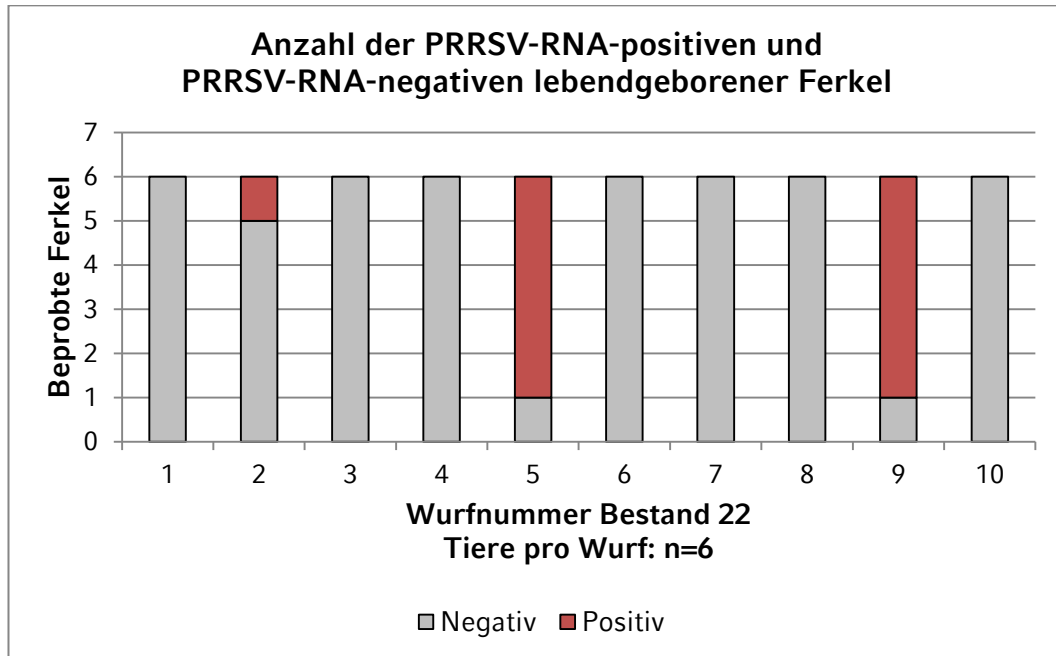


Abbildung 7: Verteilung der im Serum PRRSV-RNA-positiven und PRRSV-RNA-negativen lebenden Ferkel (n=60) des Bestands 22 auf Wurfebene

2.3.2.1.4. Sequenzierung

Es wurden zwei Serumproben zur Sequenzierung zur IVD GmbH weitergeleitet. Hierfür wurde jeweils die Probe mit dem niedrigsten Ct-Wert ausgewählt. Die PRRSV-Nukleotidsequenz der Serumprobe des Ferkels aus Bestand 21 wies im ORF5 eine Identität von 90% mit der Genotyp 1-Referenzsequenz Lelystad auf und die aus Bestand 22 eine Identität von 86%. Somit ist ein unmittelbarer phylogenetischer Zusammenhang mit dem Referenzstamm oder den Genotyp 1-Lebendimpfstoffen nicht wahrscheinlich und es wird von einer Infektion mit einem Feldvirus ausgegangen.

2.3.2.2. Tote Ferkel

2.3.2.2.1. Einzeltiere

Insgesamt wurden 27 Mumien, totgeborene, lebensschwache und während des Aufenthalts auf dem Bestand verstorbene Ferkel zur weiteren Diagnostik in die Klinik für Schweine gebracht. Diese Ferkel stammten aus Würfen, aus welchen auch lebende Ferkel und deren Muttersauen beprobt wurden. Nur vier der toten Ferkel (2.11.1-2.11.4) wurden von einer Sau (2.11) aus Bestand 22 geboren, welche während des Aufenthalts nur tote Ferkel zur Welt brachte (siehe Abbildung 1 und Abbildung 2). Von der Sau 2.11 wurde keine Blutprobe entnommen.

Mittels real-time RT-PCR wurden Einzelproben des Thymus und der Tonsillen der 27 Ferkel auf PRRSV-spezifische Genomfragmente untersucht. Die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung der Organproben sind in Tabelle 20 dargestellt. Insgesamt waren 6 von 27 der untersuchten toten Ferkel entweder im Thymus oder in den Tonsillen positiv. Im Thymus konnten bei 5 von 27 Ferkeln Genomfragmente des PRRS-Virus detektiert werden. PRRSV-positiv waren 4 von 27 der untersuchten Ferkeltonsillen. Positiv in beiden Organproben waren 3 der 27 Ferkel. In allen positiven Proben konnten nur Genomfragmente des PRRSV Genotyp 1 nachgewiesen werden.

Tabelle 20: Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung der Organe der toten Ferkel (n=27) aus Gruppe 2 auf PRRSV-spezifische Genomfragmente

PCR		Ferkel	
		(n)	%
Thymus	Positiv	5	18,5
	Negativ	22	81,5
	Σ	27	100
Tonsille	Positiv	4	14,8
	Negativ	23	85,2
	Σ	27	100
Tonsille & Thymus	Positiv	3	11,1
	Negativ	24	88,9
	Σ	27	100
Gesamt	Positiv	6	22,2
	Negativ	21	77,8
	Σ	27	100

2.3.2.2.2. Auswertung auf Bestandsebene

Insgesamt konnten 54 Organproben (27 Thymi/ 27 Tonsillen) von 27 toten Ferkeln molekularbiologisch mittels real-time RT-PCR auf PRRSV-spezifische Genomfragmente untersucht werden.

Aus Bestand 21 kamen 6 der 27 untersuchten toten Ferkel. Keines dieser Ferkel war PRRSV-positiv. Aus Bestand 22 stammten 13 der 27 untersuchten Ferkel. Insgesamt waren 5 der 13 untersuchten toten Ferkel aus Bestand 22 entweder in der Thymus- oder in der Tonsillenprobe positiv. Im Thymus konnte PRRSV-Genom in 4 von 13 untersuchten Proben und in den Tonsillen ebenfalls in 4 von 13 untersuchten Proben nachgewiesen werden. Davon konnten jeweils im Thymus und in den Tonsillen von 3 der Ferkel PRRSV-spezifische Genomfragmente detektiert werden (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung der Organe der toten Ferkel (n=13) des Bestands 22 auf PRRSV-spezifische Genomfragmente

PCR		Ferkel	
		(n)	%
Thymus	Positiv	4	30,8
	Negativ	9	69,2
	Σ	13	100
Tonsille	Positiv	4	30,8
	Negativ	9	69,2
	Σ	13	100
Tonsille und Thymus	Positiv	3	23,1
	Negativ	10	76,9
	Σ	13	100
Gesamt	Positiv	5	38,5
	Negativ	8	61,5
	Σ	13	100

Dem Bestand 23 konnten 8 der 27 untersuchten toten Ferkel zugeordnet werden. Nur in einem dieser Ferkel konnte PRRSV-RNA detektiert werden (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung der Organe der toten Ferkel (n=8) des Bestands 23 auf PRRSV-spezifische Genomfragmente

PCR		Ferkel	
		(n)	%
Thymus	Positiv	1	12,5
	Negativ	7	87,5
	Σ	8	100

2.3.2.2.3. Auswertung nach Würfen

Genomfragmente des PRRS-Virus konnten in 2 von 3 Beständen (Bestand 22 und Bestand 23) in den Organproben der toten Ferkel nachgewiesen werden. In Bezug auf die beiden positiven Bestände waren Ferkel aus 4 von 10 beprobten Würfen positiv. Innerhalb des Bestands 22 konnten in Ferkeln aus 3 von 5 Würfen und in Bestand 23 aus 1 von 5 beprobten Würfen PRRSV-spezifische Genomfragmente detektiert werden (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9).

Die Verteilung der PRRSV-positiven sowie -negativen toten Ferkel innerhalb der Würfe des Bestands 22 ist in Abbildung 8 dargestellt. Zwei der untersuchten Würfe waren negativ auf PRRSV-Genom (Wurf 4 und Wurf 10). Aus dem Wurf 2 war eines der untersuchten toten Ferkel positiv und aus Wurf 5 waren es zwei. Auch lebendgeborene Wurfgeschwister waren aus diesen beiden Würfen positiv (siehe Unterpunkt 2.3.2.1.3 und Abbildung 7).

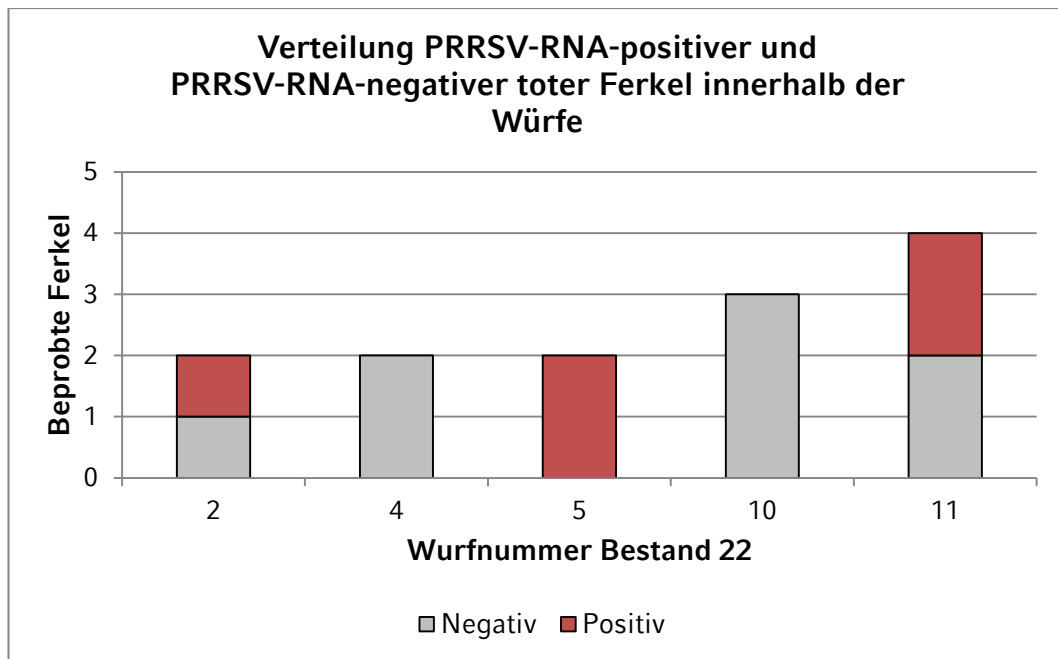


Abbildung 8: Verteilung PRRSV-RNA-positiver sowie PRRSV-RNA-negativer toter Ferkel (n=13) des Bestands 22 auf Wurfebene

Die Verteilung der PRRSV-positiven sowie -negativen toten Ferkel innerhalb der Würfe des Bestands 23 kann Abbildung 9 entnommen werden. Aus einem der untersuchten Würfe konnte PRRSV-Genom isoliert werden (Wurf 1). Aus diesem Wurf wurde nur ein Ferkel beprobt, in dessen Thymusprobe konnten PRRSV-spezifische Genomfragmente nachgewiesen werden. In keiner der untersuchten Organproben der Ferkel aus den Würfen 2, 3, 5 und 9 konnten PRRSV-Genomfragmente nachgewiesen werden (siehe Abbildung 9).

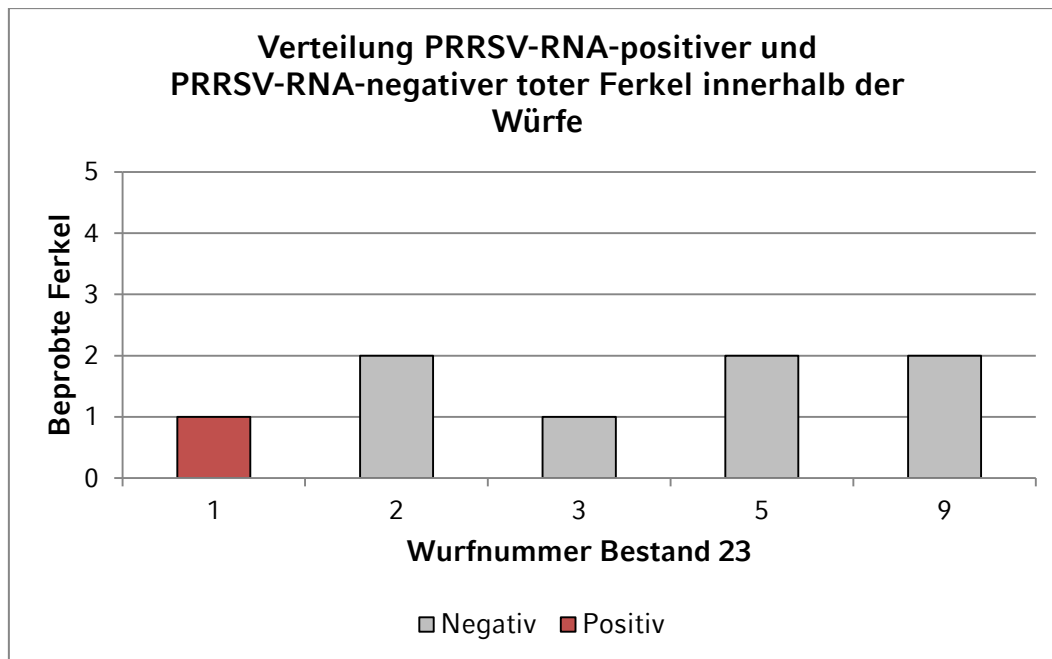


Abbildung 9: Verteilung PRRSV-RNA-positiver sowie PRRSV-RNA-negativer toter Ferkel (n=8) des Bestands 23 auf Wurfebene

2.4. Ergebnisse der Untersuchung der Serumproben der Sauen der PRRSV-positiven Ferkel

Den PRRSV-positiven Ferkeln, bei welchen in den Organen oder im Serum PRRSV-spezifische Genomfragmente mittels real-time RT-PCR nachgewiesen werden konnten, wurde der PRRSV-Status der dazugehörigen Muttersau in Tabelle 23 gegenübergestellt. Nur bei der Muttersau des positiven toten Ferkel aus Bestand 23 konnten keine Antikörper gegen PRRSV im Serum nachgewiesen werden.

Tabelle 23: Wurfweise Gegenüberstellung (einzelne Würfe durch breitere Rahmenlinien unterteilt) der Ergebnisse der serologischen sowie molekularbiologischen Untersuchungen der PRRSV-positiven Ferkel (n=23) und der dazugehörigen Muttersauen (n=8) aus Gruppe 2; positive Ferkel mit fortlaufender Nummerierung für jeden Bestand

Bestand	Ferkel				Sauen	
	Nummer	PCR Serum	PCR Organ	ELISA	PCR Serum	ELISA
21	1	+	n.d.*	-	-	+
21	2	+	n.d.	-	-	+
21	3	+	n.d.	-		
21	4	+	n.d.	-		
21	5	+	n.d.	+	-	+
21	6	+	n.d.	+		
22	1	+	n.d.	-	-	+
22	2	n.d.	+	n.d.		
22	3	+	n.d.	-	-	+
22	4	+	n.d.	-		
22	5	+	n.d.	-		
22	6	+	n.d.	-		
22	7	+	n.d.	-		
22	8	n.d.	+	n.d.		
22	9	n.d.	+	n.d.		
22	10	+	n.d.	-	-	+
22	11	+	n.d.	-		
22	12	+	n.d.	-		
22	13	+	n.d.	-		
22	14	+	n.d.	-		
22	15	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.
22	16	n.d.	+	n.d.		
23	1	n.d.	+	n.d.	-	-

*n.d. = nicht durchgeführt

V. DISKUSSION

1. Diskussion der Ergebnisse der Gruppe 1

1.1. Sauen

Über die Sero- sowie Virusprävalenz von PRRSV bei Zuchtsauen ist bisher wenig bekannt. Es wurden zwar schon viele Studien in welchen das Vorkommen von PRRSV in unterschiedlichen Altersklassen, vor allem bei Absetzferkeln und Mastschweinen, untersucht wurde durchgeführt, diese erlauben aber aufgrund der altersabhängigen Empfänglichkeit für PRRSV keine hundertprozentige Übertragung der Ergebnisse auf Sauen. In der vorliegenden Studie wurden Seren von 198 Sauen aus 20 bayerischen ferkelerzeugenden Beständen untersucht. Es waren 49,5% (98/198) der Sauen seropositiv. Somit war die Seroprävalenz vergleichbar hoch wie in einer Studie von ADAM (2015). In dessen Studie waren 56% (126/225) der Sauen aus 25 untersuchten Beständen in Bayern seropositiv.

Interessanterweise konnten bei 13,3% (12/90) der Sauen aus den Nichtimpfbetrieben der Gruppe 1 Antikörper gegen PRRSV nachgewiesen werden. In der Routinediagnostik wird die Serologie genutzt, um den Status von ungeimpften Herden zu ermitteln. Es kann bei den seropositiven Sauen der Nichtimpfbetriebe davon ausgegangen werden, dass diese schon mal mit PRRSV infiziert waren oder es zum Beprobungszeitpunkt sogar noch waren und infolgedessen Antikörper gegen PRRSV entwickelten. Da die Antikörpertiter nach einer PRRSV-Infektion ihren Höhepunkt nach 28-42 Tage p.i. erreichen und in der Regel 4-10 Monate nach Infektion nicht mehr nachweisbar sind, gestaltet es sich schwierig den Infektionszeitpunkt näher einzugrenzen. In dieser Untersuchung waren innerhalb der positiven Nichtimpfbetriebe 60% der Sauen seropositiv. Damit lag die Seroprävalenz höher als in einer Studie von GRAAGE (2014), in welcher auf zwei PRRSV-positiven Nichtimpfbetrieben in Österreich die mittlere Seroprävalenz der Zuchtsauen bei 36% lag. ADAM (2015) konnte bei 49,1% (27/55) der Sauen aus sechs nichtimpfenden Beständen Antikörper gegen PRRSV

nachweisen. Im Gegensatz dazu waren auf einem endemisch infizierten Bestand in Griechenland 80% der Sauen seropositiv (ALEXOPOULOS et al., 2005).

Im Vergleich dazu konnten im Serum von 79,6% (86/198) der geimpften Sauen Antikörper gegen PRRSV nachgewiesen werden. Es kann nicht zwischen Impfantikörpern, maternalen Antikörpern und Antikörpern durch Feldinfektionen unterschieden werden (YOON et al., 2003; ZIMMERMAN et al., 2012). Deshalb kann bei den nachgewiesenen PRRSV-spezifischen Antikörpern im Serum der Sauen der Impfbetriebe nicht zwischen Impfantikörpern oder Antikörpern durch eine Infektion differenziert werden. In der Literatur wird angegeben, dass mehrfacher Kontakt zu einem identischen Isolat, zum Beispiel in Folge einer Vakzination, häufig nicht mehr zu einem nachweisbarem Antikörperanstieg führt (GROSSE BEILAGE et al., 2013). Dies stellt eine Möglichkeit dar, weshalb bei 20,4% der Sauen der Impfbetriebe, keine PRRSV-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnten. Weitere mögliche Ursachen wären eine fehlerhafte Applikation des Impfstoffes, eine ungenügende Impfung zur Eingliederung der Jungsauen sowie ein produktionsorientiertes Impfschema welches zur Folge haben kann, dass umrauschende Sauen über einen längeren Zeitraum nicht geimpft werden. Auch in der Studie von ADAM (2015) konnten nicht bei allen Tieren aus Impfbetrieben (n=13) PRRSV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Im Durchschnitt waren 8,3 von 10 untersuchten Tieren pro Bestand seropositiv. Es wurde jedoch nicht dargestellt, wie viele dieser seropositiven Tiere Sauen und wie viele Ferkel beziehungsweise Mastschweine waren.

Adulte Schweine weisen im Gegensatz zu intrauterin oder post partum infizierten Ferkeln eine kürzere Virämie auf (YOON et al., 1993; MENGELING et al., 1994; WOESTE und GROSSE BEILAGE, 2007). Diese dauert in der Regel 1-2 Wochen an (CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 1995b). Auch Impfvirus wurde meist über einen Zeitraum von 3-12 Tagen post vaccinationem im Serum von Sauen nachgewiesen (SCORTTI et al., 2006a; SCORTTI et al., 2006b). Nach Infektion geimpfter Sauen mit PRRSV konnte bei diesen Sauen entweder keine erneute Virämie oder

eine verkürzte Virämie beobachtet werden (SCORTTI et al., 2006b). Dies würde erklären, warum in keinem der 198 untersuchten Sauenserren der Gruppe 1 PRRSV-spezifische Genomfragmente detektiert werden konnten. Auch MENGELING et al. (1994), KRANKER et al. (1998) und SCORTTI et al. (2006b) konnten PRRSV-Genom im Serum von Sauen nur 1-2 Wochen p.i. mittels Virusisolation detektieren. Im Gegensatz dazu waren in einer Studie von LADINIG et al. (2014) noch 84,7% der 111 intranasal infizierten Sauen am Tag 21 p.i. virämisch, mit der höchsten Viruslast am 6. Tag nach Infektion.

1.2. Ferkel

Es wurden bislang noch keine vergleichbaren Studien zur Häufigkeit des Vorkommens diaplazentarer Übertragung von PRRSV in Betrieben ohne PRRSV-bedingte Reproduktionsstörungen durchgeführt. In experimentellen Studien variiert die Anzahl virämisch geborener Ferkel nach Infektion der Muttersau zwischen 53,6% und 98% (MENGELING et al., 1994; MENGELING et al., 1996; KRANKER et al., 1998; MENGELING et al., 1998; FENG et al., 2001; SCORTTI et al., 2006b; CANO et al., 2009). Bezogen auf die einzelnen Würfe ist die Varianz noch höher. In den 590 präkolostral entnommenen Serumproben der Ferkel, konnten weder spezifische Antikörper gegen PRRSV noch Genomfragmente des Virus detektiert werden. Es wird angenommen, dass nach natürlich auftretenden Infektionen der Muttersau die Anzahl virämisch geborener Ferkel geringer ist. Da nicht die gesamten Würfe beprobt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es in den 20 retrospektiv untersuchten Beständen zu diaplazentaren Übertragungen von PRRSV und somit zur Geburt virämischer Ferkel kam. Eventuell war die Stichprobenzahl nicht groß genug.

Des Weiteren muss beachtet werden, dass die Studie, im Rahmen welcher diese Proben zunächst entnommen wurden, sich vor allem auf überlebensfähige (viable) Ferkel konzentrierte, da diese am nächsten Tag erneut beprobt werden mussten. In Ferkeln, welche der Kategorie „viable“ zugeordnet wurden, konnten LADINIG et al. (2014) die geringsten Virusmengen mittels real-time RT-PCR nachweisen. Im Gegensatz dazu gelang der Nachweis von PRRSV-spezifischen

Genomfragmenten im Serum, Thymus und Endometrium am häufigsten in Mekonium-gefärbten Ferkeln. Deshalb empfahlen LADINIG et al. (2014) diese für diagnostische Zwecke zu beproben.

Im Unterschied zu anderen Infektionskrankheiten, wie zum Beispiel dem *Porzinen Circovirus Typ 2* (PCV2) (RITZMANN et al., 2005; SHEN et al., 2010) oder dem *Porzinen Parvovirus* (PPV) (NIELSEN et al., 1991), kommt es bei PRRSV vor allem erst gegen Ende der Trächtigkeit zu einer transplazentaren Übertragung (MENGELING et al., 1994), obwohl die Feten jederzeit empfänglich für PRRSV sind (CHRISTIANSON et al., 1993). PRIETO et al. (1996b) infizierten frühtragende Sauen intranasal am 14. TT und wiesen eine Übertragung des Virus auf Feten nach, jedoch mit niedriger Inzidenz. Auch in der Mitte der Trächtigkeit ist eine Infektion der Feten möglich, aber sie tritt nur sehr sporadisch auf (CHRISTIANSON et al., 1993; MENGELING et al., 1994). Erst im letzten Drittel der Trächtigkeit kommt es mit höherer Wahrscheinlichkeit zu transplazentaren Übertragungen (CHRISTIANSON et al., 1993; KRANKER et al., 1998). KARNIYCHUK und NAUWYNCK (2009) zeigten in einer Studie, dass die Menge der vorhandenen CD169⁺/CD163⁺-Makrophagen im Endometrium sowie in der Plazenta am Ende der Trächtigkeit am höchsten ist. Im Gegensatz dazu wiesen die CD169⁻/CD163⁺-Makrophagen ein konstantes Level auf. Dies könnte erklären, warum es bei einer PRRSV-Infektion tragender Sauen vor allem gegen Ende der Trächtigkeit zur intrauterinen Infektion der Feten kommt (KARNIYCHUK und NAUWYNCK, 2009). Demzufolge existiert nur ein Zeitfenster von wenigen Wochen, in dem eine präpartale Infektion der Feten erfolgen kann, was auch eine Erklärung für die Ergebnisse der vorliegenden Studie sein könnte.

Ein weiterer Faktor, welcher die Häufigkeit des Auftretens natürlicher intrauteriner Infektionen mit PRRSV reduziert, ist, dass adulte Schweine in der Regel nur eine Virämie von 1-2 Wochen nach PRRSV-Infektion aufweisen (CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 1995b). Mithilfe der Vakzination der Muttersauen kann die Dauer der Virämie weiter verkürzt (LAGER et al., 2014) und dadurch die transplazentare Übertragung des PRRS-Virus reduziert werden. Infolgedessen sinkt auch der

Infektionsdruck. Nur in zwei der neun Nichtimpfbetriebe konnten bei Sauen Antikörper gegen PRRSV nachgewiesen werden. Diese Sauen waren zum Beprobungszeitpunkt nicht virämisch und auch in den Proben derer Ferkel waren zur Geburt keine PRRSV-spezifischen Genomfragmente nachweisbar.

SCORTTI et al. (2006b) führten einen Challenge-Versuch mit zwei verschiedenen Impfstoffen (Impfgruppe 1 und 2) auf Basis des Genotyps 1 und einem heterologen PRRSV Genotyp 1 Isolat durch. Die Sauen wurden 24 Tage vor der Besamung mit einem der beiden Impfstoffe vakziniert und am 90. TT intranasal infiziert. Den Ferkeln wurden präkolostral Blutproben entnommen, welche anschließend mittels Virusisolation auf PRRSV untersucht wurden. In der Nichtimpfgruppe waren 100% (30/30) der lebendgeborenen Ferkel virämisch. In der einen Impfgruppe waren nur noch 7% (5/71 Ferkeln) der Ferkel zur Geburt virämisch (aus 4 von 7 Würfen) und in der anderen Impfgruppe waren es 20,8% (11/53 Ferkeln) der Ferkel (aus 4 von 5 Würfen) (SCORTTI et al., 2006b). Eine intrauterine Infektion der Feten ist demnach trotz Impfung möglich, es wurden nach Infektion mit einem heterologen Isolat aber deutlich weniger virämische Ferkel geboren und in einigen Würfen waren alle Ferkel PRRSV-negativ (SCORTTI et al., 2006b). In einem Versuch zur protektiven Immunität von bereits infizierten Sauen nach erneuter Infektion mit PRRSV, entweder mit dem gleichen (Genotyp 2 Isolat) oder einem heterologen Isolat (Genotyp 1 Isolat), beobachteten LAGER et al. (1999) keine transplazentare Übertragung von PRRSV nach Infektion mit dem gleichen Isolat am 90. TT. Zu dem gleichen Resultat kam eine Studie im Jahr 1997 (LAGER et al., 1997b). Im Gegensatz dazu fand eine Übertragung des Virus auf die ungeborenen Feten nach Infektion mit dem heterologen PRRSV-Isolat statt, wenn auch signifikant seltener als ohne vorherige Immunisierung (LAGER et al., 1999). LAGER et al. (1999) kamen zu dem Ergebnis, dass eine protektive Immunität gegenüber homologen Isolate aufgebaut wurde, diese jedoch limitiert gegenüber heterologen Isolaten war. Zu vergleichbaren Ergebnissen kam eine Studie von HAN et al. (2014). Sie zeigten, dass die Vakzination der Muttersauen mit einem PRRSV Genotyp 2-MLV-Impfstoff die Geburt

infizierter Ferkel nach Infektion mit einem Genotyp 2 Isolat am 93. TT signifikant reduziert. Nach Infektion mit einem PRRSV Isolats des Genotyp 1 wurden jedoch vergleichbar viele Ferkel intrauterin infiziert wie ohne vorhergehende Impfung (HAN et al., 2014).

2. Diskussion der Ergebnisse der Gruppe 2

2.1. Sauen

Wie schon in der Diskussion der Ergebnisse der Sauen aus Gruppe 1 (siehe Abschnitt 1.1) aufgeführt, kann bei einem einmaligen positiven Antikörpernachweis nicht zwischen Impfantikörpern, maternalen Antikörpern und Antikörpern infolge von Feldinfektionen unterschieden werden (YOON et al., 2003; ZIMMERMAN et al., 2012). Die untersuchten Sauen aus dem Bestand 22 waren alle seropositiv. In diesem Bestand kam es trotz Impfung zu einem klinischen PRRS-Ausbruch mit Reproduktionsstörungen. Das Vorhandensein von drei seronegativen Sauen in Bestand 23, trotz Impfung, kann zum einen damit erklärt werden, dass die wiederholte Exposition mit einem identischen Isolat im Rahmen der Impfung häufig nicht mehr zu einem detektierbaren Anstieg der Antikörper führt (GROSSE BEILAGE et al., 2013). Zum anderen können, wie schon in der Diskussion der Ergebnisse der Sauen aus Gruppe 1 beschrieben, eine fehlerhafte Applikation des Impfstoffes, eine ungenügende Adaptierung der Jungsauen während der Eingliederungsphase sowie ein produktionsorientiertes Impfschema zur Folge haben, dass Sauen eines Impfbetriebs seronegativ sind.

Die 10 untersuchten Sauen des Bestands 21 waren zum Beprobungszeitpunkt alle seropositiv. Im Gegensatz zu den Sauen der Bestände 22 und 23 wurden diese nicht gegen PRRSV geimpft. Deshalb kann angenommen werden, dass diese Sauen Antikörper infolge einer Feldinfektion mit PRRSV entwickelten.

Die Tatsache, dass Sauen meist nur 1-2 Wochen virämisch sind (MENGELING et al., 1994; KRANKER et al., 1998; SCORTTI et al., 2006b), kann erklären, warum bei keiner der untersuchten Sauen der Bestände 21 und 22 trotz des klinischen Ausbruchs PRRSV-spezifische

Genomfragmente im Serum detektiert werden konnten. Auch die Sauen deren Ferkel PRRSV-positiv geboren wurden, waren zur Geburt nicht virämisch. Die untersuchten Sauen waren aus der Abferkelgruppe nach dem Abferkeldurchgang, welcher durch Spätaborte, verkürzte Trächtigkeiten sowie erhöhte Saugferkelmortalität geprägt war. Aufgrunddessen ist eine nähere Eingrenzung des möglichen Infektionszeitpunktes schwierig. Es wird davon ausgegangen, dass sich zumindest ein Teil der untersuchten Sauen gegen Ende der Trächtigkeit mit PRRSV infizierte, weil es zur Geburt PRRSV-positiver Ferkel kam. Da die 10 beprobten Sauen des Bestands 22 schon vor dem Ausbruch vakziniert wurden, kann die Dauer der Virämie verkürzt worden sein (SCORTTI et al., 2006b). Die Impfung der Sauen erfolgte mit einem MLV-Impfstoff auf Basis des Genotyps 2. Das im Serum der Ferkel nachgewiesene PRRS-Virus war vom Genotyp 1, aufgrund dessen konnte es trotz allem zu einem epidemischen Krankheitsverlauf in Bestand 22 kommen (LAGER et al., 1999).

Auch in keiner der Sauenserien aus Bestand 23 konnten PRRSV-spezifische Genomfragmente nachgewiesen werden. Die Herde des Bestands 23 war trotz Impfung endemisch mit einem Isolat des Genotyps 1 infiziert. In der Literatur wird beschrieben, dass in endemisch infizierten Herden intrauterine Übertragungen sporadisch auftreten können (GROSSE BEILAGE et al., 2013). Keines der untersuchten lebendgeborenen Ferkel war präkolostral virämisch, aber im Thymus eines totgeborenen Ferkels konnte virale RNA detektiert werden. Die dazugehörige Muttersau (3.1) war seronegativ. Es besteht die Möglichkeit, dass diese Muttersau kurz vor der Beprobung virämisch war und zum Beprobungszeitpunkt noch keinen detektierbaren Antikörpertiter entwickelt hatte. In einer Studie von KRANKER et al. (1998) waren fünf der elf infizierten Sauen nur eine Woche virämisch. Infolge einer Impfung kann die Dauer der Virämie weiterhin verkürzt werden (SCORTTI et al., 2006b). Des Weiteren ist der Antikörpernachweis mittels ELISA erst 9-13 Tage p.i. möglich (YOON et al., 1995). Somit kann bei Sauen ein Zeitfenster von knapp einer Woche existieren, in welchem weder PRRSV-spezifische Genomfragmente noch

Antikörper nachweisbar sind. Eine andere Möglichkeit ist, dass diese Sau persistent mit PRRSV infiziert war und eine Virusübertragung auf die ungeborenen Ferkel ohne nachweisbaren Antikörperanstieg im Serum der Muttersau stattfand. In einer Studie von KLEIBOEKER et al. (2002) waren 31,5% (17/54) der untersuchten Sauen eines endemisch infizierten Bestandes trotz einer persistenten PRRSV-Infektion seronegativ. In anderen Studien verblieben die Schweine, welche persistent infiziert waren, bis zum letzten Virusnachweis seropositiv (WILLS et al., 1997a; ALLENDE et al., 2000; HORTER et al., 2002). Bei diesen seropositiven Schweinen handelte es sich jedoch um experimentell infizierte Ferkel, keine adulten Tiere. WILLS et al. (1997a) konnten das RNA-Virus bis zu 157 Tage nach der Infektion aus oropharyngealen Kratzproben von Ferkeln isolieren, welche im Alter von vier Wochen intranasal infiziert wurden. Ihnen gelang der Virusnachweis in den Kratzproben noch einige Wochen nach dem höchsten Antikörpertiter sowie dem letzten Nachweis von Genomfragmenten im Serum (WILLS et al., 1997a). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen FANGMAN et al. (2007). Sie konnten Impfvirus in Tonsillenkratzproben von Ferkeln, welche im Alter von sieben Wochen mit einem MLV-Impfstoff geimpft wurden, noch am 160. Tag post vaccinationem mittels real-time RT-PCR nachweisen (FANGMAN et al., 2007).

Eine Persistenz können Schweine jeden Alters entwickeln (CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 1995b; WILLS et al., 1997a; ROWLAND et al., 1999; HORTER et al., 2002). Auch ist eine Übertragung des Virus von persistent infizierten Schweinen auf naive Schweine möglich, selbst wenn im Serum kein Virus mehr nachweisbar ist (BENFIELD et al., 2000). Auf diesem Weg kann PRRSV endemisch in Herden persistieren und durch klinisch unauffällige Trägartiere eine Elimination verkomplizieren. Inwieweit eine persistente Infektion der Muttersau ausreicht, um diaplazentar PRRS-Virus auf ihre Feten zu übertragen, wurde bisher noch nicht untersucht. Da das Virus vermutlich über intravaskuläre Monozyten zu den Feten gelangt (KARNIYCHUK et al., 2011), wäre eine Virämie der Sau zur Übertragung nötig.

Auch ist es nicht wahrscheinlich, dass die Sau 3.11 virämisch war, dies aber nicht detektiert wurde. Die in dieser Studie angewandte real-time RT-PCR erfolgte nach dem von KLEIBOEKER et al. (2005) entwickelten Protokoll. Für diese real-time RT-PCR gaben sie eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 97,6% im Vergleich zur nested RT-PCR an (KLEIBOEKER et al., 2005). Da das in dieser Untersuchung verwendete Protokoll nur in wenigen Nukleotidsequenzen verändert wurde (siehe Tabelle 9 und Tabelle 10), wird davon ausgegangen, dass die von KLEIBOEKER et al. (2005) ermittelten Werte übertragen werden können.

Es wurden noch keine Studien durchgeführt, welche die Auswirkung der Parität der Muttersau auf die intrauterine Übertragung von PRRSV untersuchten. Die Parität der Muttersauen schien in dieser Untersuchung keinen Einfluss auf die Geburt virämischer Ferkel zu haben. Von den 6 Muttersauen, welche die 17 PRRSV-positiven lebendgeborenen Ferkel zur Welt brachten, waren drei der Muttersauen der Paritätsgruppe 2 und drei der Muttersauen der Paritätsgruppe 3 zugehörig.

2.2. Ferkel

Es wurden noch keine Studien zur Häufigkeit des Vorkommens diaplazentarer Übertragung von PRRSV nach natürlicher Infektion der Muttersau durchgeführt. Aufgrund dessen müssen die Ergebnisse dieser Studie mit Untersuchungen experimentellen Charakters verglichen werden. In den schon durchgeführten Studien kamen, nach experimenteller Infektion der Muttersau, zwischen 41,7% und 98% der Ferkel PRRSV-positiv zur Welt (CHRISTIANSON et al., 1992; MENGELING et al., 1994; MENGELING et al., 1996; KRANKER et al., 1998; MENGELING et al., 1998; FENG et al., 2001; SCORTTI et al., 2006b; CANO et al., 2009). Auch gibt es noch keine Prävalenzstudien zur Geburt virämischer lebender Ferkel nach natürlicher Infektion der Muttersau. In den Infektionsversuchen variiert der Anteil virämisch geborener Ferkel zwischen 53,6% und 98% (TERPSTRA et al., 1991; LAGER und HALBUR, 1996; KRANKER et al., 1998; FENG et al., 2001; CANO et al., 2009). Im Vergleich zu den experimentellen Studien waren in der vorliegenden Studie deutlich weniger Ferkel PRRSV-positiv. In dieser Untersuchung wurden in 13% (23/177) der präkolostral beprobten

Ferkeln aus den Beständen 21-23 entweder im Serum oder in den Organproben PRRSV-spezifische Genomfragmente detektiert. PRRSV-Genom konnte in 11,3% (17/150) der 150 gewonnenen Serumproben der Ferkel nachgewiesen werden. Diese 17 PRRSV-positiven Ferkel kamen aus den Beständen 21 und 22.

In den aufgeführten experimentellen Studien wurden die Sauen gezielt zwischen dem 85. und 98. TT infiziert. Nach Infektion am Anfang oder in der Mitte der Trächtigkeit, waren stets weniger Ferkel zur Geburt PRRSV-positiv (CHRISTIANSON et al., 1993; KRANKER et al., 1998). KRANKER et al. (1998) führten eine Studie durch, in welcher sie Sauen entweder am 72. TT oder am 85. TT intranasal mit PRRSV infizierten. Nach Infektion am 85. TT waren 66% der Ferkel PRRSV-positiv. Im Vergleich dazu waren nach Infektion der Muttersauen am 72. TT nur 45% der Ferkel mit PRRSV infiziert. KRANKER et al. (1998) kamen zu dem Schluss, dass eine Infektion auch im mittleren Drittel der Trächtigkeit möglich ist, wobei die Prävalenz virämisch geborener Ferkel geringer ist. Dies sollte mit Vorsicht betrachtet werden, da die Sauen aus jener Studie, welche schon am 72. TT infiziert wurden, für 2-4 Wochen virämisch waren. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Übertragung des PRRS-Virus auf die Feten erst gegen Ende der Trächtigkeit stattgefunden hat. In einer vergleichbaren Studie von MENGELING et al. (1994) waren nach intravenöser Infektion der Muttersauen zwischen dem 50. und 72. TT zur Geburt nur 9% der Ferkel PRRSV-positiv. Dagegen betrug der Anteil der intrauterin infizierten Ferkel nach intravenöser Infektion der Muttersauen am 90.-92. TT 64,7%.

Im Gegensatz zu jenen Infektionsversuchen war in dieser Studie nicht bekannt, wann die Infektion der Sauen mit PRRSV erfolgte. Da in den Betrieben 21 und 22 schon in der vorherigen Abferkelgruppe massive Reproduktionsstörungen in Form von Spätaborten, lebensschwach geborenen Ferkeln sowie erhöhten Saugferkelmortalitätszahlen auftraten, ist davon auszugehen, dass das Virus schon einige Wochen im Bestand zirkulierte. Dafür spricht auch, dass die Sauen zum Zeitpunkt der Geburt nicht mehr virämisch waren. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden,

dass die 30 beprobten Sauen schon in der Mitte der Trächtigkeit virämisch waren und deshalb deutlich weniger Ferkel PRRSV-positiv zur Welt kamen.

Auch ist zu berücksichtigen, dass die Sauen aus den obengenannten experimentellen Versuchen gezielt und mit einer bekannten Erregermenge entweder intranasal (CHRISTIANSON et al., 1992; KRANKER et al., 1998; FENG et al., 2001; HAN et al., 2013) beziehungsweise oronasal (MENGELING et al., 1998), intravenös (MENGELING et al., 1994) oder intramuskulär (CANO et al., 2009; LADINIG et al., 2014) infiziert wurden, um auch sicher eine Virämie auszulösen. Des Weiteren wurden seronegative Sauen infiziert, welche zuvor noch keine protektive Immunität gegen PRRSV entwickelt hatten. Es ist weder bekannt, wie der Status der ungeimpften Sauen aus dem Bestand 21 vor der PRRSV-Infektion war, noch auf welchem Wege sie sich mit PRRSV infizierten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Sauen schon einmal mit PRRSV infiziert waren. In einer Studie von LAGER et al. (1997a) waren die Sauen noch am 604. Tag p.i. immunkompetent gegenüber einem homologen Isolat und es wurden keine transplazentaren Infektionen beobachtet.

Die 20 Sauen aus den Beständen 22 und 23 wurden mit einer MLV-Vakzine auf Basis des Genotyps 2 gegen PRRSV geimpft und in den Ferkeln konnten Genomfragmente des Genotyps 1 nachgewiesen werden. Aus verschiedenen Studien (siehe auch Abschnitt 1.2) geht hervor, dass eine intrauterine Infektion der Ferkel trotz Impfung möglich ist, es aber zu einer deutlichen Reduktion der Häufigkeit intrauteriner Übertragungen von PRRSV kommt (LAGER et al., 1999; SCORTTI et al., 2006b). Nach Infektion mit einem homologen Isolat wurden keine intrauterinen Infektionen mehr beobachtet (LAGER et al., 1997b, 1999), wohingegen nach Infektion mit heterologen Isolaten resp. dem jeweils anderen Genotyp intrauterine Infektionen auftraten. Letzteres trat jedoch seltener auf, als in den Fällen ohne vorherige Impfung (LAGER et al., 1999; SCORTTI et al., 2006b). HAN et al. (2014) zeigten, dass eine Vakzination mit einem PRRSV Genotyp 2-MLV-Impfstoff die Geburt infizierter Ferkel nach erneuter Infektion mit einem Genotyp 2 Isolat

signifikant reduziert. Nach Infektion mit dem PRRSV Genotyp 1 wurden jedoch vergleichbar viele Ferkel intrauterin infiziert, wie ohne vorhergehende Impfung.

Diese Ergebnisse entsprechen auch denen der vorliegenden Untersuchung. Im Vergleich der Bestände 21 und 22, in welchen virämische Ferkel detektiert wurden, kann wie in der Studie von HAN et al. (2014), keine Reduktion der Anzahl virämisch geborener Ferkel nach Impfung mit einem abweichenden Isolat beobachtet werden. Im Bestand 22 waren 21,9% (16/73) der untersuchten Ferkelproben positiv. Es konnten PRRSV-spezifische Genomfragmente in 18,3% (11/60) der Serumproben und in 5 von 13 Organproben nachgewiesen werden. Im Bestand 21, einem bis dato ungeimpften Bestand, waren 16,7% (6/36) der untersuchten Ferkel aus 3 von 10 Würfen PRRSV Genotyp 1-positiv. Die positiven Ferkel kamen alle lebend zur Welt, somit waren 20% (6/30) der lebendgeborenen Ferkel aus Bestand 22 virämisch. Im Bestand 23 konnten nur in einem totgeborenen Ferkel PRRSV-spezifische Genomfragmente des Genotyp 1 im Thymus nachgewiesen werden. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass in diesem Bestand auch keine massiven Reproduktionsstörungen, sondern nur sporadisch Spätaborte auftraten. GROSSE BEILAGE et al. (2013) schrieben, dass intrauterine PRRSV-Infektionen sporadisch auch in endemisch infizierten Herden auftreten können. Dies deckt sich mit den Untersuchungsergebnissen des Bestands 23.

Interessanterweise hatten zwei der präkolostral virämischen Ferkel schon spezifische Antikörper gegen PRRSV zur Geburt ausgebildet. Diese beiden Ferkel stammten aus dem gleichen Wurf (Wurf 9) aus Bestand 21. Das dritte aus diesem Wurf beprobte Ferkel war ebenfalls virämisch, hatte aber zur Geburt noch keine Antikörper entwickelt. Da die epitheliochoriale Plazenta der Schweine aus sechs Schichten besteht und somit eine schwer zu durchdringende Barriere darstellt, welche maternale Antikörper nicht durchdringen können (ŠTERZL et al., 1966), erreicht PRRSV die Feten möglicherweise zu unterschiedlichen Zeitpunkten (KARNIYCHUK et al., 2011). Dies würde erklären, warum nur zwei der Ferkel präpartal Antikörper ausgebildet hatten. Im

Allgemeinen wird darin auch ein Grund für das Vorkommen von mumifizierten und lebensschwachen Ferkel, neben gesunden Ferkeln innerhalb eines Wurfes gesehen. In verschiedenen Studien wurden präkolostrale Antikörper bei Ferkeln nachgewiesen, von denen die Wurfgeschwister virämisch aber noch seronegativ waren (KRANKER et al., 1998; HAN et al., 2013). Ferkel sind ab dem 70. TT immunkompetent (NIELSEN et al., 1991) und folglich in der Lage, Antikörper zu bilden. Antikörper gegen PRRSV können mittels ELISA ab dem 9. Tag p.i. nachgewiesen werden (YOON et al., 1995), sicher ab dem 14. Tag p.i. (CANO et al., 2009). Dies bedeutet, dass die Infektion der Ferkel bereits vor mindestens 9-14 Tagen stattfand. Im Bestand 22 waren alle präkolostral virämischen Ferkel seronegativ. Dies legt den Verdacht nahe, dass die Infektion der Ferkel in diesem Bestand erst später erfolgte.

Im Gegensatz zu postnatalen Infektionen mit PRRSV, bei welchen die Lunge den Ort der Hauptreplikation darstellt (ROSSOW et al., 1995), ist dies bei präpartal infizierten Ferkeln der Thymus (HAN et al., 2013; LADINIG et al., 2014). Einen Grund für diese unterschiedliche Manifestation stellt der Infektionsweg dar. Ungeborene Ferkel werden transplazentar infiziert, wohingegen Ferkel postpartal das PRRS-Virus vor allem oronasal aufnehmen und dieses dadurch in die Lunge gelangt. Das Virus konnte in verschiedenen fetalen Organen wie Lunge, Leber, Milz, Nieren, Gehirn und Herz von intrauterin infizierten Ferkeln nachgewiesen werden (CHEON und CHAE, 2000, 2001). Überwiegend gelang der Nachweis aber in lymphatischen Geweben und in diesen am häufigsten im fetalen Thymus (CHEON und CHAE, 2001; HAN et al., 2013; LADINIG et al., 2014). In 6 der 27 toten Ferkel konnten in einer der Organproben PRRSV-Genomfragmente nachgewiesen werden. Es waren numerisch mehr Ferkel im Thymus positiv als in den Tonsillen (5 von 27 vers. 4 von 27). Dies deckt sich mit publizierten Untersuchungen zur Verteilung des PRRS-Virus innerhalb der Feten nach intrauteriner Infektion (CHEON und CHAE, 2001; HAN et al., 2013; LADINIG et al., 2014). Auch nach Impfung der Muttersauen sind vor allem in den lymphatischen Organen, allen voran im Thymus, Genomfragmente zu finden (HAN et al., 2014). Hinsichtlich der Verteilung von PRRSV in den Organen der Ferkel ist kein

Unterschied zwischen Genotyp 1 und Genotyp 2 erkennbar (CHEON und CHAE, 2001; HAN et al., 2013). LADINIG et al. (2014) beschrieben, dass große Mengen viraler RNA vor allem im Thymus, im Serum und im Endometrium Mekonium-gefärbter Ferkel gefunden werden können und empfehlen vor allem diese Ferkel für Diagnostikzwecke zu beproben (siehe Abbildung 2). In autolytischen Ferkeln sowie in Mumien konnte kaum Virus nachgewiesen werden (MENGELING et al., 1994; LADINIG et al., 2014). Auch in der vorliegenden Studie gelang der Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente nur in *post partum* verstorbenen sowie in Mekonium-gefärbten Ferkeln.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Studie war es, das Vorkommen intrauteriner Infektionen von Feten mit PRRSV zu evaluieren. Die vertikale Übertragung von PRRSV wurde bereits in zahlreichen experimentellen Infektionsversuchen untersucht, jedoch wurden nur wenige Studien zur diaplazentaren Übertragung nach natürlicher Infektion der Muttersau durchgeführt.

Im Rahmen dieser Studie wurden Proben von 228 Sauen und 767 Ferkeln aus 23 Beständen untersucht. Die Untersuchung wurde in zwei Teile gegliedert. Zunächst wurden vorhandene Serumproben von 198 Sauen und 590 Ferkeln aus 20 randomisiert ausgewählten ferkelerzeugenden Betrieben aus Bayern (Gruppe 1) retrospektiv ausgewertet. Aus diesen Betrieben wurden je 10 Sauen und je Sau 3 Ferkel in die Studie eingeschlossen. Die Blutprobenentnahme bei den Ferkeln erfolgte direkt nach der Geburt noch vor Kolostrumaufnahme und bei den Muttersauen nach der Geburt des letzten Ferkels. Im zweiten Teil dieser Studie wurden aus drei Beständen (Bestand 21-23; Gruppe 2) mit Reproduktionsstörungen Serumproben von 30 Sauen und 150 Ferkeln nach dem gleichen Probenentnahmeschema wie im ersten Versuchsteil entnommen. In den Beständen 22 und 23 wurde die Anzahl der beprobten Ferkel auf 6 Ferkel pro Zuchtsau erhöht. Des Weiteren wurden 27 totgeborene und verstorbene Ferkel aus den drei Beständen zur weiteren Diagnostik mitgenommen. Im Anschluss wurden alle Serumproben mittels ELISA auf spezifische Antikörper gegen PRRSV sowie mittels real-time RT-PCR auf PRRSV-spezifische Genomfragmente getestet. Von den toten Ferkeln wurden jeweils eine Tonsillen- sowie eine Thymusprobe mittels real-time RT-PCR untersucht.

In den Serumproben der Sauen aus Gruppe 1 konnten bei 49,5% (98/198) der Sauen PRRSV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. In 11 der 20 Bestände wurden die Sauen gegen PRRSV geimpft. Von den geimpften Sauen waren 79,6% (86/108) seropositiv. Innerhalb der 9 ungeimpften Bestände waren 13,3% (12/90) der Sauen seropositiv.

Antikörper gegen PRRSV waren auf 2 der 9 Nichtimpfbetriebe im Serum der Sauen nachweisbar. Bei keiner der Sauen der Gruppe 1 konnten zum Beprobungszeitpunkt PRRSV-spezifische Genomfragmente im Serum nachgewiesen werden. Alle 590 Ferkel waren präkolostral seronegativ, außerdem war kein Ferkel zur Geburt virämisch.

In Gruppe 2 waren 90% (27/30) der Sauen seropositiv. In 2 der 3 Bestände wurden die Sauen gegen PRRSV geimpft. Bei 17 der 20 geimpften Sauen konnten Antikörper gegen PRRSV nachgewiesen werden. Alle Sauen des Bestands ohne PRRSV-Impfung waren seropositiv. Bei keiner der Sauen der Gruppe 2 konnten zum Beprobungszeitpunkt PRRSV-spezifische Genomfragmente im Serum detektiert werden. Es kamen 2 der 150 (1,3%) beprobten Ferkel mit Antikörpern gegen PRRSV zur Welt. Beide Ferkel stammten aus dem gleichen Wurf aus Bestand 21. PRRSV-spezifische Genomfragmente konnten in 13,0% (23/177) der untersuchten Ferkel mittels real-time RT-PCR nachgewiesen werden. Von den lebendgeborenen Ferkeln waren 11,3% (17/150) präkolostral virämisch. Diese stammten aus den Beständen 21 und 22. Bezogen auf die beiden positiven Bestände wurden 18,9% (17/90) der Ferkel virämisch geboren. Es waren 6 von 27 untersuchten toten Ferkeln aus 2 der 3 Bestände (Bestände 22 und 23) entweder im Thymus oder in den Tonsillen oder in beiden Organen PRRSV-positiv. Bei diesen handelte es sich um Mekonium-gefärbte oder post partum verstorbene Ferkel.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Sauen nach natürlicher Infektion mit PRRSV während der Trächtigkeit das Virus diaplazentar auf die Feten übertragen können und es zur Geburt PRRSV-infizierter Ferkel kommen kann. Im Gegensatz dazu scheint die intrauterine Erregerübertragung in Beständen ohne Reproduktionsstörungen durch PRRSV von geringer Bedeutung zu sein. Die alleinige Beprobung der Muttersauen erscheint nicht ausreichend, da in dieser Studie bei keiner der Sauen, welche PRRSV-positive Ferkel zur Welt brachten, Genomfragmente des PRRS-Virus nachgewiesen werden konnten und eine dieser Sauen sogar seronegativ war.

VII. SUMMARY

The objective of the present study was to evaluate the occurrence of fetal intrauterine infections with PRRSV. The possibility of a vertical transmission of PRRSV has already been examined in several experimental infection studies. However, there are hardly any studies that describe the occurrence of transplacental transmission following natural infection of the dams.

In this study, samples of 228 sows and 767 suckling piglets of 23 farms were examined. This study was divided into two parts. First, pre-existing serum samples of 198 sows and 590 suckling piglets of 20 randomly selected farms of Bavaria (Group 1) were analysed retrospectively. From each farm 10 breeding sows and 3 corresponding piglets were included in the study. The blood samples of the piglets were taken before ingestion of colostrum and the blood samples from the sows were taken after birth of the last piglet. In the second part of the study, blood samples of 30 sows and 150 suckling piglets of 3 farms (farms 21-23; Group 2) with reproductive failure were taken following the same sampling procedure. In the farms 22 and 23 the amount of examined piglets was raised and 6 piglets of every sow were sampled. In addition, 27 stillborn piglets or piglets that died within a few hours were saved for following diagnostics. Thereafter all serum samples were analysed by ELISA for specific anti-PRRSV antibodies and by real-time RT-PCR for PRRSV genome. From the dead piglets, samples of the tonsils and the thymus were analysed by real-time RT-PCR.

In the serum samples from the sows of group 1 specific anti-PRRSV antibodies were detected in 49.5% (98/198) of all tested samples. 11 of 20 farms vaccinated the sows against PRRSV. 79.6% (86/108) of these sows were seropositive. Within the 9 farms without vaccination against PRRSV 13.3% (12/90) of the sows were seropositive. In 2 out of the 9 non-vaccinating farms specific anti-PRRSV antibodies could be detected. None of the altogether 198 sows was viremic at the timing of sampling.

All 590 piglets were seronegative before the ingestion of colostrum and none of the piglets was viremic at the time of birth.

In Group 2, 90% (27/30) of the sows were seropositive. In 2 out of the 3 farms the sows were vaccinated against PRRSV. Antibodies against PRRSV could be detected in 17 of the 20 vaccinated sows. All sows of the unvaccinated farm were seropositive. None of the sows of group 2 was viremic at the time of sampling. Two of 150 (1.3%) suckling-piglets were born seropositive. Both were from the same litter from farm 21. PRRSV-specific genome could be detected by real-time RT-PCR in 13.0% (23/177) of the examined piglets. In total 11.3% (17/150) of the liveborn piglets were viremic before the ingestion of colostrum. These piglets were from the farms 21 and 22. Considering only the positive farms, 18.9% (17/90) of the piglets were born viremic. Six of 27 dead piglets were positive for PRRSV either in the tonsils or in the thymus or in both. All of these were meconium-stained piglets or piglets that died after birth.

The results of this study demonstrate that following natural infection of sows with PRRSV during the gestation period, the virus can transplacentally infect the foetus, thus the birth of PRRS-positive piglets is possible. In contrast, it seems like that the intrauterine transmission of virus in farms without reproductive failure following PRRSV infection is of less significance. Taking exclusively samples of dams does not seem to be sufficient, because in none of the sows of this study that gave birth to PRRSV-positive piglets PRRSV-genome could be detected and one of these sows even was seronegative.

VIII. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: ORF-kodierte Proteine nach LUNNEY et al. (2016)</i>	<i>5</i>
<i>Tabelle 2: Ausscheidungsdauer von PRRSV nach experimenteller Infektion.....</i>	<i>6</i>
<i>Tabelle 3: PRRSV-Impfstoffe mit gültiger Zulassung in Deutschland (PAUL-EHRLICH-INSTITUT, 2017)</i>	<i>19</i>
<i>Tabelle 4: Studienbetriebe Gruppe 1, geografische Lage der Bestände, PRRSV-Impfstatus der Sauen, Zuchtsauen und Anzahl der untersuchten Schweine pro Bestand</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 5: Verwendeter PRRSV-Impfstoff zur Vakzination der Sauen in den 20 Beständen der Gruppe 1 (x=zutreffendes Impfregime)</i>	<i>25</i>
<i>Tabelle 6: Studienbetriebe Gruppe 2, geografische Lage der Bestände, PRRSV-Impfstatus der Sauen, Zuchtsauen und Anzahl der untersuchten Schweine pro Bestand</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 7: Verwendeter PRRSV-Impfstoff zur Vakzination der Sauen in den 3 Beständen der Gruppe 2 (x=zutreffendes Impfregime)</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 8: Temperaturprotokoll der durchgeführten real-time RT-PCR nach KLEIBOEKER et al. (2005), modifiziert.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 9: Für die real-time RT-PCR verwendete Primer* (KLEIBOEKER et al., 2005).....</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 10: Für die real-time RT-PCR verwendete TaqMan-Sonden* (KLEIBOEKER et al., 2005).....</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 11: Einstufung der mittels real-time PCR ermittelten Ct-Werte..</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 12: Einteilung der Sauen (n=198) der Bestände 1-20 nach Paritätsgruppen und Zuordnung der Ferkel (n=590)</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 13: Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Serumproben der Muttersauen (n=198) aus Gruppe 1 auf PRRSV-spezifische Antikörper unterteilt nach Impfstatus</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 14: Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Serumproben der Muttersauen (n=198) aus Gruppe 1 auf PRRSV-spezifische Antikörper unterteilt nach Parität</i>	<i>38</i>

<i>Tabelle 15: Ergebnisse der serologischen Untersuchung auf PRRSV-spezifische Antikörper der Serumproben der Muttersauen (n=198) aus Gruppe 1 unterteilt nach Impfstatus und Paritätsgruppe</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 16: Einteilung der Sauen (n=30) der Bestände 21-23 nach Paritätsgruppen und Zuordnung der Ferkel (n=150).....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 17: Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Serumproben der Muttersauen (n=30) aus Gruppe 2 auf PRRSV-spezifische Antikörper unterteilt nach Impfstatus</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 18: Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Serumproben der Muttersauen (n=30) aus Gruppe 2 auf PRRSV-spezifische Antikörper unterteilt nach Parität.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 19: Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Serumproben der Muttersauen (n=30) aus Gruppe 2 auf PRRSV-spezifische Antikörper unterteilt nach Impfstatus und Paritätsgruppe....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 20: Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung der Organe der toten Ferkel (n=27) aus Gruppe 2 auf PRRSV-spezifische Genomfragmente</i>	<i>46</i>
<i>Tabelle 21: Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung der Organe der toten Ferkel (n=13) des Bestands 22 auf PRRSV-spezifische Genomfragmente</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 22: Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung der Organe der toten Ferkel (n=8) des Bestands 23 auf PRRSV-spezifische Genomfragmente</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 23: Wurfweise Gegenüberstellung (einzelne Würfe durch breitere Rahmenlinien unterteilt) der Ergebnisse der serologischen sowie molekularbiologischen Untersuchungen der PRRSV-positiven Ferkel (n=23) und der dazugehörigen Muttersauen (n=8) aus Gruppe 2; positive Ferkel mit fortlaufender Nummerierung für jeden Bestand</i>	<i>51</i>

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Unterschiedlich weit entwickelte totgeborene Ferkel innerhalb eines Wurfes nach PRRSV-Infektion der Muttersau.....</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 2: Zwei totgeborene Mekonium-gefärbte Ferkel der Sau 2.11 aus Bestand 22</i>	<i>18</i>
<i>Abbildung 3: Verteilung der seropositiven sowie der seronegativen Sauen (n=198) der Gruppe 1 auf den Beständen</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 4: Anzahl seropositiver sowie seronegativer Sauen (n=198) aus Gruppe 1 in den einzelnen Beständen unterteilt nach Impfstatus.....</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 5: Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung der Serum- und Organproben der Ferkel (n=177) aus Gruppe 2 auf PRRSV-spezifische Genomfragmente</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 6: Verteilung der im Serum PRRSV-RNA-positiven und PRRSV-RNA-negativen lebendgeborenen Ferkel (n=30) des Bestands 21 auf Wurfebene</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 7: Verteilung der im Serum PRRSV-RNA-positiven und PRRSV-RNA-negativen lebenden Ferkel (n=60) des Bestands 22 auf Wurfebene</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 8: Verteilung PRRSV-RNA-positiver sowie PRRSV-RNA-negativer toter Ferkel (n=13) des Bestands 22 auf Wurfebene</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 9: Verteilung PRRSV-RNA-positiver sowie PRRSV-RNA-negativer toter Ferkel (n=8) des Bestands 23 auf Wurfebene</i>	<i>50</i>

X. LITERATURVERZEICHNIS

Adam L. Untersuchungen zum Vorkommen von PRRSV in einem definierten Gebiet in Bayern sowie Bewertung von Einflussfaktoren auf den PRRSV-Infektionsstatus. Diss. med. vet. 2015. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Albina E, Leforban Y, Baron T, Plana Duran JP, Vannier P. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Ann Rech Vet* 1992; 23: 167-176.

Alexopoulos C, Kritas SK, Kyriakis CS, Tzika E, Kyriakis SC. Sow performance in an endemically porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)-infected farm after sow vaccination with an attenuated PRRS vaccine. *Vet Microbiol* 2005; 111: 151-157.

Allende R, Lewis TL, Lu Z, Rock DL, Kutish GF, Ali A, Doster AR, Osorio FA. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J Gen Virol* 1999; 80: 307-315.

Allende R, Laegreid WW, Kutish GF, Galeota JA, Wills RW, Osorio FA. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J Virol* 2000; 74: 10834-10837.

Andreyev VG, Wesley RD, Mengeling WL, Vorwald AC, Lager KM. Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. *Arch Virol* 1997; 142: 993-1001.

Baker SR, Mondaca E, Polson D, Dee SA. Evaluation of a needle-free injection device to prevent hematogenous transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Swine Health Prod* 2012; 20: 123-128.

Bautista EM, Goyal SM, Yoon IJ, Joo HS, Collins JE. Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5: 163-165.

Benfield DA, Nelson E, Collins JE, Harris L, Goyal SM, Robison D, Christianson WT, Morrison RB, Gorcyca D, Chladek D. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest* 1992; 4: 127-133.

Benfield DA, Nelson JK, Rossow K, Nelson C, Steffen M, Rowland RR. Diagnosis of persistent or prolonged porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections. *Vet Res* 2000; 31: 71.

Beyer J, Fichtner D, Schirrmeier H, Polster U, Weiland E, Wege H. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): Kinetics of infection in lymphatic organs and lung. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2000; 47: 9-25.

Bierk MD, Dee SA, Rossow KD, Otake S, Collins JE, Molitor TW. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from persistently infected sows to contact controls. *Can J Vet Res* 2001; 65: 261-266.

Bøtner A, Nielsen J, Bille-Hansen V. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a Danish swine herd and experimental infection of pregnant gilts with the virus. *Vet Microbiol* 1994; 40: 351-360.

Bøtner A, Strandbygaard B, Sorensen KJ, Have P, Madsen KG, Madsen ES, Alexandersen S. Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet Rec* 1997; 141: 497-499.

Calvert JG, Slade DE, Shields SL, Jolie R, Mannan RM, Ankenbauer RG, Welch SK. CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol* 2007; 81: 7371-7379.

Cano JP, Dee SA, Murtaugh MP, Pijoan C. Impact of a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine intervention on a population of pigs infected with a heterologous isolate. *Vaccine* 2007a; 25: 4382-4391.

Cano JP, Dee SA, Murtaugh MP, Trincado CA, Pijoan CB. Effect of vaccination with a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine on dynamics of homologous viral infection in pigs. *Am J Vet Res* 2007b; 68: 565-571.

Cano JP, Dee SA, Murtaugh MP, Rovira A, Morrison RB. Infection dynamics and clinical manifestations following experimental inoculation of gilts at 90 days of gestation with a low dose of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res* 2009; 73: 303-307.

Carlsson U, Wallgren P, Renstrom LH, Lindberg A, Eriksson H, Thoren P, Eliasson-Selling L, Lundeheim N, Norregard E, Thorn C, Elvander M. Emergence of porcine reproductive and respiratory syndrome in Sweden: detection, response and eradication. *Transbound Emerg Dis* 2009; 56: 121-131.

Cavanagh D. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 1997; 142: 629-633.

Chareerntantanakul W, Platt R, Johnson W, Roof M, Vaughn E, Roth JA. Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 109: 99-115.

Cheon DS, Chae C. Comparison of virus isolation, reverse transcription-polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from naturally aborted fetuses and stillborn piglets. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12: 582-587.

Cheon DS, Chae C. Distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in stillborn and liveborn piglets from experimentally infected sows. *J Comp Pathol* 2001; 124: 231-237.

Christianson WT, Collins JE, Benfield DA, Harris L, Gorcyca DE, Chladek DW, Morrison RB, Joo HS. Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am J Vet Res* 1992; 53: 485-488.

Christianson WT, Choi CS, Collins JE, Molitor TW, Morrison RB, Joo HS. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can J Vet Res* 1993; 57: 262-268.

Christopher-Hennings J, Nelson EA, Nelson JK, Hines RJ, Swenson SL, Hill HT, Zimmerman JJ, Katz JB, Yaeger MJ, Chase CC, Benfield DA. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J Clin Microbiol* 1995a; 33: 1730-1734.

Christopher-Hennings J, Nelson EA, Hines RJ, Nelson JK, Swenson SL, Zimmerman JJ, Chase CL, Yaeger MJ, Benfield DA. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J Vet Diagn Invest* 1995b; 7: 456-464.

Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris L, Hennings JC, Shaw DP, Goyal SM, McCullough S, Morrison RB, Joo HS, Gorcyca D, Chladek D. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* 1992; 4: 117-126.

Collins JE, Dee S, Halbur PG, Keffaber K, Lautner B, McCaw M, Rodibaugh M, Sanford E, Yeske P. Laboratory diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *Swine Health Prod* 1996; 4: 33-35.

Conzelmann KK, Visser N, Van Woensel P, Thiel HJ. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology* 1993; 193: 329-339.

Costers S, Lefebvre DJ, Delputte PL, Nauwynck HJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages. *Arch Virol* 2008; 153: 1453-1465.

Das PB, Dinh PX, Ansari IH, de Lima M, Osorio FA, Pattnaik AK. The minor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor CD163. *J Virol* 2010; 84: 1731-1740.

Dea S, Bilodeau R, Athanaseous R, Sauvageau RA, Martineau GP. PRRS syndrome in Quebec: isolation of a virus serologically related to Lelystad virus. *Can Vet Rec* 1992; 130: 167-167.

Dee SA, Deen J, Otake S, Pijoan C. An experimental model to evaluate the role of transport vehicles as a source of transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to susceptible pigs. *Can J Vet Res* 2004; 68: 128-133.

Delputte PL, Vanderheijden N, Nauwynck HJ, Pensaert MB. Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *J Virol* 2002; 76: 4312-4320.

Delputte PL, Costers S, Nauwynck HJ. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. *J Gen Virol* 2005; 86: 1441-1445.

Dewey CE, Wilson S, Buck P, Leyenaar JK. The reproductive performance of sows after PRRS vaccination depends on stage of gestation. *Prev Vet Med* 1999; 40: 233-241.

Drew TW, Meulenbergh JJM, Sands JJ, Paton DJ. Production, characterization and reactivity of monoclonal antibodies to porcine and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 1995; 76: 1361-1369.

Duan X, Nauwynck HJ, Pensaert MB. Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol* 1997a; 56: 9-19.

Duan X, Nauwynck HJ, Pensaert MB. Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Arch Virol* 1997b; 142: 2483-2497.

Egli C, Thur B, Liu L, Hofmann MA. Quantitative TaqMan RT-PCR for the detection and differentiation of European and North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol Methods* 2001; 98: 63-75.

Fang Y, Treffers EE, Li Y, Tas A, Sun Z, van der Meer Y, de Ru AH, van Veelen PA, Atkins JF, Snijder EJ, Firth AE. Efficient -2 frameshifting by mammalian ribosomes to synthesize an additional arterivirus protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 2920-2928.

Fangman TJ, Kleiboeker SB, Coleman M. Tonsillar crypt exudate to evaluate shedding and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus after inoculation with live field virus or vaccination with modified live virus vaccine. *J Swine Health Prod* 2007; 15: 219-223.

Fano E, Pijoan C, Dee S. Evaluation of the aerosol transmission of a mixed infection of *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Rec* 2005; 157: 105-108.

Feng WH, Laster SM, Tompkins M, Brown T, Xu JS, Altier C, Gomez W, Benfield D, McCaw MB. In utero infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus is sufficient to increase susceptibility of piglets to challenge by *Streptococcus suis* type II. *J Virol* 2001; 75: 4889-4895.

Feng WH, Tompkins MB, Xu JS, Brown TT, Laster SM, Zhang HX, McCaw MB. Thymocyte and peripheral blood T lymphocyte subpopulation changes in piglets following in utero infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 2002; 302: 363-372.

Graage RS. Nachweis des porzinen reproduktiven und respiratorischen Syndrom Virus in Serum- und in Speichelproben. Diss. med. vet. 2014. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Gradil C, Dubuc C, Eaglesome MD. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: seminal transmission. *Vet Rec* 1996; 138: 521-522.

Grøntvedt CA, Sjurseth SK, Er C. The surveillance programme for specific viral infections in swine herds in Norway 2014. In: Surveillance programmes for terrestrial and aquatic animals in Norway. Annual Report 2014. Oslo, Norway, Norwegian Veterinary Institute 2015.

Grosse Beilage E, Nathues H, Grummer B, Hartung J, Kamphues J, Kietzmann M, Rohde J, Spindler B, Weissenböck H. Diagnostik, Prophylaxe und Therapie von Atemwegserkrankungen in Schweinebeständen. In: Diagnostik und Gesundheitsmanagement im Schweinebestand, 1. Auflage 2013. eds. Grosse Beilage E, Wendt M. Stuttgart, Eugen Ulmer. 200-270.

Halbur PG, Miller LD, Paul PS, Meng XJ, Huffman EL, Andrews JJ. Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old colostrum-deprived pigs. Vet Pathol 1995; 32: 200-204.

Halbur PG, Paul PS, Meng XJ, Lum MA, Andrews JJ, Rathje JA. Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrum-deprived pig model. J Vet Diagn Invest 1996a; 8: 11-20.

Halbur PG, Paul PS, Frey ML, Landgraf J, Eernisse K, Meng XJ, Andrews JJ, Lum MA, Rathje JA. Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. Vet Pathol 1996b; 33: 159-170.

Han K, Seo HW, Oh Y, Kang I, Park C, Ha BC, Kim SH, Chae C. Pathogenesis of Korean type 1 (European Genotype) Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Experimentally Infected Pregnant Gilts. J Comp Pathol 2013; 148: 396-404.

Han K, Seo HW, Park C, Chae C. Vaccination of sows against type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) before artificial insemination protects against type 2 PRRSV challenge but does not protect against type 1 PRRSV challenge in late gestation. *Vet Res* 2014; 45: 12.

Harms PA, Sorden SD, Halbur PG, Bolin SR, Lager KM, Morozov I, Paul PS. Experimental Reproduction of Severe Disease in CD/CD Pigs Concurrently Infected with Type 2 Porcine Circovirus and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet Pathol* 2001; 38: 528-539.

Hermann JR, Munoz-Zanzi CA, Roof MB, Burkhart K, Zimmerman JJ. Probability of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection as a function of exposure route and dose. *Vet Microbiol* 2005; 110: 7-16.

Horter DC, Pogranichniy RM, Chang CC, Evans RB, Yoon KJ, Zimmerman JJ. Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Microbiol* 2002; 86: 213-228.

Johnson CR, Griggs TF, Gnanandarajah J, Murtaugh MP. Novel structural protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by an alternative ORF5 present in all arteriviruses. *J Gen Virol* 2011; 92: 1107-1116.

Karniychuk UU, Nauwynck HJ. Quantitative changes of sialoadhesin and CD163 positive macrophages in the implantation sites and organs of porcine embryos/fetuses during gestation. *Placenta* 2009; 30: 497-500.

Karniychuk UU, Saha D, Geldhof M, Vanhee M, Cornillie P, Van den Broeck W, Nauwynck HJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) causes apoptosis during its replication in fetal implantation sites. *Microb Pathog* 2011; 51: 194-202.

Karniychuk UU, Saha D, Vanhee M, Geldhof M, Cornillie P, Caij AB, De Regge N, Nauwynck HJ. Impact of a novel inactivated PRRS virus vaccine on virus replication and virus-induced pathology in fetal implantation sites and fetuses upon challenge. *Theriogenology* 2012a; 78: 1527-1537.

Karniychuk UU, Van Breedam W, Van Roy N, Rogel-Gaillard C, Nauwynck HJ. Demonstration of microchimerism in pregnant sows and effects of congenital PRRSV infection. *Vet Res* 2012b; 43: 19.

Karniychuk UU, Nauwynck HJ. Pathogenesis and prevention of placental and transplacental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Res* 2013; 44: 1-14.

Keffaber KK. Reproductive failure of unknown etiology. *Am Assoc Swine Pract News* 1989; 1: 1-10.

Kim HS, Kwang J, Yoon IJ, Joo HS, Frey ML. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol* 1993; 133: 477-483.

Kleiboeker SB, Lehman JR, Fangman TJ. Concurrent use of reverse transcription-polymerase chain reaction testing of oropharyngeal scrapings and paired serological testing for detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in sows. *J Swine Health Prod* 2002; 10: 251-258.

Kleiboeker SB, Schommer SK, Lee SM, Watkins S, Chittick W, Polson D. Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR. *J Vet Diagn Invest* 2005; 17: 165-170.

Klinge KL, Vaughn EM, Roof MB, Bautista EM, Murtaugh MP. Age-dependent resistance to Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in swine. *Virology* 2009; 6: 177.

Kranker S, Nielsen J, Bille-Hansen V, Botner A. Experimental inoculation of swine at various stages of gestation with a Danish isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Veterinary Microbiology* 1998; 61: 21-31.

Kreutz LC, Ackermann MR. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Research* 1996; 42: 137-147.

Kruse PE. The importance of colostral immunoglobulins and their absorption from the intestine of the newborn animals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1983; 14: 349-353.

Ladinig A, Wilkinson J, Ashley C, Detmer SE, Lunney JK, Plastow G, Harding JC. Variation in fetal outcome, viral load and ORF5 sequence mutations in a large scale study of phenotypic responses to late gestation exposure to type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *PLoS One* 2014; 9: 1-11.

Ladinig A, Ashley C, Detmer SE, Wilkinson JM, Lunney JK, Plastow G, Harding JC. Maternal and fetal predictors of fetal viral load and death in third trimester, type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected pregnant gilts. *Veterinary Research* 2015; 46: 107.

Lager KM, Halbur PG. Gross and microscopic lesions in porcine fetuses infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1996; 8: 275-282.

Lager KM, Mengeling WL, Brockmeier SL. Duration of homologous porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. *Vet Microbiol* 1997a; 58: 127-133.

Lager KM, Mengeling WL, Brockmeier SL. Homologous challenge of porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. *Vet Microbiol* 1997b; 58: 113-125.

Lager KM, Mengeling WL, Brockmeier SL. Evaluation of protective immunity in gilts inoculated with the NADC-8 isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and challenge-exposed with an antigenically distinct PRRSV isolate. *Am J Vet Res* 1999; 60: 1022-1027.

Lager KM, Schlink SN, Brockmeier SL, Miller LC, Henningson JN, Kappes MA, Kehrli ME, Loving CL, Guo B, Swenson SL, Yang HC, Faaberg KS. Efficacy of Type 2 PRRSV vaccine against Chinese and Vietnamese HP-PRRSV challenge in pigs. *Vaccine* 2014; 32: 6457-6462.

Larochelle R, Mardassi H, Dea S, Magar R. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cell cultures and formalin-fixed tissues by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8: 3-10.

Li H, Yang J, Bao D, Hou J, Zhi Y, Yang Y, Ji P, Zhou E, Qiao S, Zhang G. Development of an immunochromatographic strip for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Sci* 2017: in press.

Li S, Wang J, Zhou A, Khan FA, Hu L, Zhang S. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus triggers mitochondrial fission and mitophagy to attenuate apoptosis. *Oncotarget* 2016; 7: 56002-56012.

Li Y, Wang X, Bo K, Wang X, Tang B, Yang B, Jiang W, Jiang P. Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the Mid-Eastern region of China. *Vet J* 2007; 174: 577-584.

Li Y, Wang G, Liu Y, Tu Y, He Y, Wang Z, Han Z, Li L, Li A, Tao Y, Cai X. Identification of apoptotic cells in the thymus of piglets infected with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 2014; 189: 29-33.

Lindhaus W, Lindhaus B. Rätselhafte Schweinekrankheit. *Prakt Tierarzt* 1991; 72: 423-425.

Linhares DC, Cano JP, Wetzell T, Nerem J, Torremorell M, Dee SA. Effect of modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) vaccine on the shedding of wild-type virus from an infected population of growing pigs. *Vaccine* 2012; 30: 407-413.

Loula T. Mystery pig-disease. *Agri-Pract* 1991; 12: 23-34.

Loving CL, Brockmeier SL, Sacco RE. Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. *Immunology* 2007; 120: 217-229.

Lunney JK, Fang Y, Ladinig A, Chen NH, Li YH, Rowland B, Renukaradhya GJ. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annu Rev Anim Biosci* 2016; 4: 129-154.

Magar R, Laroche R, Robinson Y, Dubuc C. Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using colloidal gold. *Can J Vet Res* 1993; 57: 300-304.

Magar R, Robinson Y, Dubuc C, Larochelle R. Isolation and experimental oral transmission in pigs of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *Adv Exp Med Biol* 1995; 380: 139-144.

Mardassi H, Wilson L, Mounir S, Dea S. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2197-2203.

McConico A, Butters K, Lien K, Knudsen B, Wu X, Platt JL, Ogle BM. In utero cell transfer between porcine littermates. *Reprod Fertil Dev* 2011; 23: 297-302.

Meng XJ. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol* 2000; 74: 309-329.

Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC. Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am J Vet Res* 1994; 55: 1391-1398.

Mengeling WL, Vorwald AC, Lager KM, Brockmeier SL. Comparison among strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus for their ability to cause reproductive failure. *Am J Vet Res* 1996; 57: 834-839.

Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC. Clinical effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on pigs during the early postnatal interval. *Am J Vet Res* 1998; 59: 52-55.

Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC, Clouser DF. Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Microbiol* 2003; 93: 25-38.

Meulenberg JJ, Hulst MM, de Meijer EJ, Moonen PL, den Besten A, de Kluyver EP, Wensvoort G, Moormann RJ. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* 1993; 192: 62-72.

Meulenberg JJ, Petersen-den Besten A, De Kluyver EP, Moormann RJ, Schaaper WM, Wensvoort G. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 1995; 206: 155-163.

Meulenberg JJ, Petersen den Besten A, de Kluyver E, van Nieuwstadt A, Wensvoort G, Moormann RJ. Molecular characterization of Lelystad virus. *Vet Microbiol* 1997; 55: 197-202.

Mossman HW. Vertebrate fetal membranes: Comparative ontogeny and morphology, evolution, phylogenetic significance, basic functions, research opportunities. Rutgers University Press, New Brunswick, N.J, 1987. 383.

Murtaugh MP, Stadejek T, Abrahante JE, Lam TT, Leung FC. The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 2010; 154: 18-30.

Nathues C, Perler L, Bruhn S, Suter D, Eichhorn L, Hofmann M, Nathues H, Baechlein C, Ritzmann M, Palzer A, Grossmann K, Schupbach-Regula G, Thur B. An Outbreak of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Switzerland Following Import of Boar Semen. *Transbound Emerg Dis* 2016; 63: 251-261.

Nauwynck HJ, Duan X, Favoreel HW, Van Oostveldt P, Pensaert MB. Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *J Gen Virol* 1999; 80: 297-305.

Nielsen HS, Oleksiewicz MB, Forsberg R, Stadejek T, Botner A, Storgaard T. Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. *J Gen Virol* 2001; 82: 1263-1272.

Nielsen J, Ronsholt L, Sorensen KJ. Experimental in utero infection of pig foetuses with porcine parvovirus (PPV). *Vet Microbiol* 1991; 28: 1-11.

Nielsen J, Bøtner A, Tingstedt JE, Aasted B, Johnsen CK, Riber U, Lind P. In utero infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates leukocyte subpopulations in peripheral blood and bronchoalveolar fluid of surviving piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 93: 135-151.

Nieuwenhuis N, Duinhof TF, van Nes A. Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds. *Vet Rec* 2012; 170: 225.

OIE. World Animal Health 1991. Animal Health Status and Disease Control Methods (Part One: Reports) 1992; 7: 109-347.

Olanratmanee EO, Thanawongnuwech R, Kunavongkrit A, Tummaruk P. Reproductive performance of sows with and without PRRS modified live virus vaccination in PRRS-virus-seropositive herds. *Trop Anim Health Prod* 2014; 46: 1001-1007.

Oleksiewicz MB, Bøtner A, Madsen KG, Storgaard T. Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. *Vet Microbiol* 1998; 64: 7-22.

Otake S, Dee SA, Rossow KD, Deen J, Joo HS, Molitor TW, Pijoan C. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by fomites (boots and coveralls). *J Swine Health Prod* 2002a; 10: 59-65.

Otake S, Dee SA, Rossow KD, Moon RD, Pijoan C. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen). *Can J Vet Res* 2002b; 66: 191-195.

Otake S, Dee SA, Rossow KD, Moon RD, Trincado C, Pijoan C. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by houseflies (*Musca domestica*). *Vet Rec* 2003; 152: 73-76.

Otake S, Dee S, Corzo C, Oliveira S, Deen J. Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Vet Microbiol* 2010; 145: 198-208.

Papatsiros VG, Alexopoulos C, Kritas SK, Koptopoulos G, Nauwynck HJ, Pensaert MB, Kyriakis SC. Long-term administration of a commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-inactivated vaccine in PRRSV-endemically infected sows. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006; 53: 266-272.

Park C, Seo HW, Kang I, Jeong J, Choi K, Chae C. A new modified live porcine reproductive and respiratory syndrome vaccine improves growth performance in pigs under field conditions. *Clin Vaccine Immunol* 2014; 21: 1350-1356.

Paul-Ehrlich-Institut. PEI Liste zugelassener Impfstoffe für Schweine. <http://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoff-impfstoffe-fuer-tiere/schweine/schweine-node.html>. Accessed 20.02.2017.

Pejsak Z, Markowska-Daniel I. Randomised, placebo-controlled trial of a live vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus in sows on infected farms. *Vet Rec* 2006; 158: 475-478.

Pitkin A, Deen J, Otake S, Moon R, Dee S. Further assessment of houseflies (*Musca domestica*) as vectors for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under field conditions. *Can J Vet Res* 2009; 73: 91-96.

Plagemann PG. Peptide ELISA for measuring antibodies to N-protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol Methods* 2006; 134: 99-118.

Plana-Duran J, Bastons M, Urniza A, Vayreda M, Vila X, Mane H. Efficacy of an inactivated vaccine for prevention of reproductive failure induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 1997; 55: 361-370.

Plana J, Vayreda M, Vilarrasa J, Bastons M, Rosell R, Martinez M, San Gabriel A, Pujols J, Badiola JL, Ramos JA, Domingo M. Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease. *Vet Microbiol* 1992; 33: 203-211.

Pol JM, van Dijk JE, Wensvoort G, Terpstra C. Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)). *Vet Q* 1991; 13: 137-143.

Prather RS, Rowland RR, Ewen C, Tribble B, Kerrigan M, Bawa B, Teson JM, Mao J, Lee K, Samuel MS, Whitworth KM, Murphy CN, Egen T, Green JA. An intact sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) is not required for attachment/internalization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol* 2013; 87: 9538-9546.

Prieto C, Suarez P, Bautista JM, Sanchez R, Rillo SM, Simarro I, Solana A, Castro JM. Semen changes in boars after experimental infection with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Theriogenology* 1996a; 45: 383-395.

Prieto C, Sanchez R, Martin-Rillo S, Suarez P, Simarro I, Solana A, Castro JM. Exposure of gilts in early gestation to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Rec* 1996b; 138: 536-539.

Prieto C, Suarez P, Simarro I, Garcia C, Fernandez A, Castro JM. Transplacental infection following exposure of gilts to porcine reproductive and respiratory syndrome virus at the onset of gestation. *Vet Microbiol* 1997a; 57: 301-311.

Prieto C, Suarez P, Simarro I, Garcia C, Martin-Rillo S, Castro JM. Insemination of susceptible and preimmunized gilts with boar semen containing porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* 1997b; 47: 647-654.

Provost C, Jia JJ, Music N, Levesque C, Lebel ME, del Castillo JR, Jacques M, Gagnon CA. Identification of a new cell line permissive to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and replication which is phenotypically distinct from MARC-145 cell line. *Virol J* 2012; 9: 267-281.

Reicks DL, Munoz-Zanzi C, Rossow K. Sampling of adult boars during early infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus for testing by polymerase chain reaction using a new blood collection technique (blood-swab method). *J Swine Health Prod* 2006; 14: 258-264.

Ritzmann M, Wilhelm S, Zimmermann P, Etschmann B, Bogner KH, Selbitz HJ, Heinritzi K, Truyen U. Prävalenz und Assoziation von porzinem Circovirus Typ 2 (PCV2), porzinem Parvovirus (PPV) und porzinem reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in abortierten Feten, mumifizierten Feten, totgeborenen und lebensschwach geborenen Ferkeln. Dtsch Tierarztl Wochenschr 2005; 112: 348-351.

Rossow KD, Bautista EM, Goyal SM, Molitor TW, Murtaugh MP, Morrison RB, Benfield DA, Collins JE. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. J Vet Diagn Invest 1994; 6: 3-12.

Rossow KD, Collins JE, Goyal SM, Nelson EA, Christopher-Hennings J, Benfield DA. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. Vet Pathol 1995; 32: 361-373.

Rossow KD, Benfield DA, Goyal SM, Nelson EA, Christopher-Hennings J, Collins JE. Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs. Vet Pathol 1996a; 33: 551-556.

Rossow KD, Laube KL, Goyal SM, Collins JE. Fetal microscopic lesions in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced abortion. Vet Pathol 1996b; 33: 95-99.

Rossow KD. Porcine reproductive and respiratory syndrome. Vet Pathol 1998; 35: 1-20.

Rossow KD, Shivers JL, Yeske PE, Polson DD, Rowland RR, Lawson SR, Murtaugh MP, Nelson EA, Collins JE. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in neonatal pigs characterised by marked neurovirulence. Vet Rec 1999; 144: 444-448.

Rowland RR, Steffen M, Ackerman T, Benfield DA. The evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: quasispecies and emergence of a virus subpopulation during infection of pigs with VR-2332. *Virology* 1999; 259: 262-266.

Rowland RR. The interaction between PRRSV and the late gestation pig fetus. *Virus Res* 2010; 154: 114-122.

Rüsse I. Frühgravidität, Implantation und Plazentation. In: *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*, 3rd edn 2015. eds. Rüsse I, Sinowatz F. Fred Sinowatz Verlag. 147-192.

Schulze M, Revilla-Fernandez S, Schmoll F, Grossfeld R, Griessler A. Effects on boar semen quality after infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a case report. *Acta Vet Scand* 2013; 55: 16.

Scortti M, Prieto C, Martinez-Lobo FJ, Simarro I, Castro JM. Effects of two commercial European modified-live vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in pregnant gilts. *Vet J* 2006a; 172: 506-514.

Scortti M, Prieto C, Simarro I, Castro JM. Reproductive performance of gilts following vaccination and subsequent heterologous challenge with European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* 2006b; 66: 1884-1893.

Scortti M, Prieto C, Alvarez E, Simarro I, Castro JM. Failure of an inactivated vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome to protect gilts against a heterologous challenge with PRRSV. *Vet Rec* 2007; 161: 809-813.

Seuberlich T, Tratschin JD, Thur B, Hofmann MA. Nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection and differentiation of antibodies against European and North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 1183-1191.

Shen H, Wang C, Madson DM, Opriessnig T. High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America. *Prev Vet Med* 2010; 97: 228-236.

Shimizu M, Yamada S, Murakami Y, Morozumi T, Kobayashi H, Mitani K, Ito N, Kubo M, Kimura K, Kobayashi M, et al. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from Heko-Heko disease of pigs. *J Vet Med Sci* 1994; 56: 389-391.

Shin J, Bautista EM, Kang YB, Molitor TW. Quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA in semen by single-tube reverse transcription-nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1998; 72: 67-79.

Sirinarumitr T, Zhang Y, Kluge JP, Halbur PG, Paul PS. A pneumo-virulent United States isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis in bystander cells both in vitro and in vivo. *J Gen Virol* 1998; 79: 2989-2995.

Sørensen KJ, Strandbygaard B, Botner A, Madsen ES, Nielsen J, Have P. Blocking ELISA's for the distinction between antibodies against European and American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 1998; 60: 169-177.

Spagnuolo-Weaver M, Walker IW, Campbell ST, McNeilly F, Adair BM, Allan GM. Rapid detection of porcine reproductive and respiratory syndrome viral nucleic acid in blood using a fluorimeter based PCR method. *Vet Microbiol* 2000; 76: 15-23.

Šterzl J, Rejnek J, Trávníček J. Impermeability of pig placenta for antibodies. *Folia Microbiol* 1966; 11: 7-10.

Stevenson GW, Van Alstine WG, Kanitz CL, Keffaber KK. Endemic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of nursery pigs in two swine herds without current reproductive failure. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5: 432-434.

Stockhofe-Zurwieden N, Navarro Camarro JA, Grosse-Beilage E, Chavez J, Pohlenz J. Uterine and placental alterations in pregnant sows associated with the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS). *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 1993; 40: 261-271.

Storgaard T, Oleksiewicz M, Botner A. Examination of the selective pressures on a live PRRS vaccine virus. *Arch Virol* 1999; 144: 2389-2401.

Suarez P, Zardoya R, Prieto C, Solana A, Tabares E, Bautista JM, Castro JM. Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). *Arch Virol* 1994; 135: 89-99.

Sur JH, Cooper VL, Galeota JA, Hesse RA, Doster AR, Osorio FA. In vivo detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA by in situ hybridization at different times postinfection. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2280-2286.

Swenson SL, Hill HT, Zimmerman JJ, Evans LE, Landgraf JG, Wills RW, Sanderson TP, McGinley MJ, Brevik AK, Ciszewski DK, et al. Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *J Am Vet Med Assoc* 1994; 204: 1943-1948.

Terpstra C, Wensvoort G, Pol JM. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. *Vet Q* 1991; 13: 131-136.

Thacker EL, Halbur PG, Ross RF, Thanawongnuwech R, Thacker BJ. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 620-627.

Thacker EL. Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2001; 17: 551-565.

Tian K, Yu X, Zhao T, Feng Y, Cao Z, Wang C, Hu Y, Chen X, Hu D, Tian X, Liu D, Zhang S, Deng X, Ding Y, Yang L, Zhang Y, Xiao H, Qiao M, Wang B, Hou L, Wang X, Yang X, Kang L, Sun M, Jin P, Wang S, Kitamura Y, Yan J, Gao GF. Emergence of Fatal PRRSV Variants: Unparalleled Outbreaks of Atypical PRRS in China and Molecular Dissection of the Unique Hallmark. *PLoS ONE* 2007; 2: 1-10.

Van Alstine WG, Stevenson GW, Kanitz CL. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Swine Health Prod* 1993; 1: 24-28.

Van Breedam W, Van Gorp H, Zhang JQ, Crocker PR, Delputte PL, Nauwynck HJ. The M/GP(5) glycoprotein complex of porcine reproductive and respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner. *PLoS Pathog* 2010; 6: 1-11.

Van der Linden IF, Voermans JJ, van der Linde-Bril EM, Bianchi AT, Steverink PJ. Virological kinetics and immunological responses to a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of pigs at different ages. *Vaccine* 2003; 21: 1952-1957.

Van Gorp H, Van Breedam W, Delputte PL, Nauwynck HJ. Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 2008; 89: 2943-2953.

Van Woensel P, Van der Wouw J, Visser N. Detection of porcine reproductive respiratory syndrome virus by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1994; 47: 273-278.

Vanderheijden N, Delputte PL, Favoreel HW, Vandekerckhove J, Van Damme J, van Woensel PA, Nauwynck HJ. Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J Virol* 2003; 77: 8207-8215.

Veijalainen PM-L, Tapiovaara H. No Aujeszky's disease or PRRS in Finland. *Vet Res* 2000; 31: 153-154.

Wagstrom EA, Chang CC, Yoon KJ, Zimmerman JJ. Shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mammary gland secretions of sows. *Am J Vet Res* 2001; 62: 1876-1880.

Wensvoort G, Terpstra C, Pol JMA, Terlaak EA, Bloemraad M, Dekluyver EP, Kragten C, Vanbuiten L, Denbesten A, Wagenaar F, Broekhuijsen JM, Moonen P, Zetstra T, Deboer EA, Tibben HJ, Dejong MF, Vantveld P, Groenland GJR, Vangennep JA, Voets MT, Verheijden JHM, Braamskamp J. Mystery swine disease in the Netherlands - the isolation of Lelystad virus. *Vet Q* 1991; 13: 121-130.

Wensvoort G, Dekluyver EP, Luijtz EA, Denbesten A, Harris L, Collins JE, Christianson WT, Chladek D. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. *J Vet Diagn Invest* 1992; 4: 134-138.

Wensvoort G. Lelystad virus and the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome. *Vet Res* 1993; 24: 117-124.

Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, Swenson SL, McGinley MJ, Hill HT, Platt KB, Christopher-Hennings J, Nelson EA. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Vet Microbiol* 1997a; 55: 231-240.

Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, Swenson SL, Hoffman LJ, McGinley MJ, Hill HT, Platt KB. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Vet Microbiol* 1997b; 57: 69-81.

Wills RW, Gray JT, Fedorka-Cray PJ, Yoon KJ, Ladely S, Zimmerman JJ. Synergism between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and *Salmonella choleraesuis* in swine. *Vet Microbiol* 2000; 71: 177-192.

Wills RW, Doster AR, Galeota JA, Sur JH, Osorio FA. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 58-62.

Woeste K, Grosse Beilage E. Die Übertragung von Erregern des porcine respiratory disease complex (PRDC) zwischen Schweineherden - eine Literaturübersicht, 1. Mitteilung - Diagnostik, Übertragung durch Tierkontakte. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2007; 114: 324-337.

Wu WH, Fang Y, Farwell R, Steffen-Bien M, Rowland RR, Christopher-Hennings J, Nelson EA. A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology* 2001; 287: 183-191.

Yaeger MJ, Prieve T, Collins J, Christopher-Hennings J, Nelson E, Benfield D. Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. *Swine Health Prod* 1993; 1: 7-9.

Yoon IJ, Joo HS, Christianson WT, Kim HS, Collins JE, Morrison RB, Dial GD. An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J Vet Diagn Invest* 1992; 4: 144-147.

Yoon IJ, Joo HS, Christianson W, Morrison B. Persistence and contact infection in nursery pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Swine Health Prod* 1993; 1: 5-8.

Yoon IJ, Joo HS, Goyal SM, Molitor TW. A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *J Vet Diagn Invest* 1994; 6: 289-292.

Yoon K, Zimmerman J, Swenson S, McGinley M, Eernisse K, Brevik A, Rhinehart L, Frey M, Hill H, Platt K. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J Vet Diagn Invest* 1995; 7: 305-312.

Yoon KJ, Zimmerman JJ, Chang CC, Cancel-Tirado S, Harmon KM, McGinley MJ. Effect of challenge dose and route on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in young swine. *Vet Res* 1999; 30: 629-638.

Yoon KJ, Christopher-Hennings J, Nelson E. Diagnosis of PRRS Virus. *PRRS Compendium Producer Edition* 2003: 57-67.

Zhang M, Xie Z, Xie L, Deng X, Xie Z, Luo S, Liu J, Pang Y, Khan MI. Simultaneous detection of eight swine reproductive and respiratory pathogens using a novel GeXP analyser-based multiplex PCR assay. *J Virol Methods* 2015; 224: 9-15.

Zimmerman JJ, Benfield AD, Dee SD, Murtaugh M, Stadejek T, Stevenson GW, Torremorell M. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus). In: Diseases of Swine, 10th edn 2012. eds. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW. Blackwell Publishing. 461-486.

Zuckermann FA, Garcia EA, Luque ID, Christopher-Hennings J, Doster A, Brito M, Osorio F. Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. Vet Microbiol 2007; 123: 69-85.

XI. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Mathias Ritzmann für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie für das stets offene Ohr bei kleinen und großen Problemen bedanken. Durch deine freundliche und geduldige Art, trägst du maßgeblich zu der guten Stimmung in dieser Klinik bei.

Ebenfalls bedanke ich mich ganz herzlich bei meinem Betreuer Herrn Dr. Matthias Eddicks für die lehrreichen Ausführungen, die vielen Anregungen und Korrekturen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Robert Fux und seinem Team für die Unterstützung in der Ausführung der labordiagnostischen Tätigkeiten und die geduldige und humorvolle Beantwortung aller Fragen.

Bei allen Mitarbeitern der Klinik für Schweine bedanke ich mich für ihre Mithilfe bei der Durchführung dieser Studie und ihre stetige Unterstützung auch spontan und vor allem nachts. Vielen Dank für diese herrliche Zeit und das wunderbare und freundschaftliche Arbeitsklima. So bin ich jeden Tag mit Freude in die Klinik gefahren.

Ein großer Dank gilt den Landwirten und den bestandsbetreuenden Tierärzten, ohne Sie wäre die Durchführung dieser Studie nicht möglich gewesen. Vielen Dank für Ihr Vertrauen!

Bei der Firma MERIAL GmbH bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Meinen Freunden in der Heimat sowie all den tollen Menschen, welche ich hier in München kennenlernen durfte, gilt ein herzliches Dankeschön. Ihr habt immer ein offenes Ohr für die kleinen Hindernisse des Lebens und könnt jeden Tag in einen besonderen verwandeln. Vielen Dank für eure Aufmunterungen, euren Humor und eure Freundschaft!

Meinen Eltern – Papa, danke für die zahlreichen Profi-Korrekturen –, meinen Geschwistern, meinen Großeltern und meinem Freund Pascal gilt das letzte große Dankeschön für die liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen. Durch euch wurde ich zu dem Menschen, der ich heute bin. Ihr seid großartig und es ist einfach wunderbar, dass es euch gibt!